



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-196873
 (43)Date of publication of application : 27.07.1999

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 A01K 67/027
 A61K 39/00
 A61K 39/395
 A61K 45/00
 A61K 48/00
 C07K 14/47
 C07K 16/18
 C12N 1/21
 C12P 21/02
 C12Q 1/02
 C12Q 1/48
 C12Q 1/68
 // C12P 21/08
 (C12P 21/02
 C12R 1:19)

(21)Application number : 09-369757

(71)Applicant : SMITHKLINE BEECHAM CORP

(22)Date of filing : 09.12.1997

(72)Inventor : PETER COLON MCDONNELL
YOUNG PETER RONALD

(54) PROTEIN BINDING TO MEDICINE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having a specific amino acid sequence and useful for expressing the protein (OSBP β) capable of binding to a cytokine suppressive anti-inflammatory drug (CSAID).

SOLUTION: This isolated polynucleotide is selected from a polynucleotide having at least 75% identity with a polypeptide having an amino acid sequence of the formula, a polynucleotide encoding the same amino acid sequence by the multiplicity of genetic codes, a polynucleotide complementary to the above polynucleotides, and a polynucleotide containing at least the 15 continuous bases of the above three polynucleotides. The isolated polynucleotide is obtained by a standard cloning and screening method such as a cDNA-cloning method based on an mRNA from sperm and T-cells.

Asp Ser Lys Ile Arg Lys Lys Lys Glu Phe Tyr Ile Gln Asn Lys Ser Ile Val
 1 8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 88 96 104
 His Ala Thr Lys Lys Phe Cys Tyr Ser Ile Ser Gln Val Gln
 2 10 18 26 34 42 50 58 66 74 82 90 98 106
 Ser Gly A 1 Ty 2 Ile 3 Asp 4 Tyr 5 Asp 6 Asn 7 Ile 8 Ser 9 Asp 10
 3 11 19 27 35 43 51 59 67 75 83 91 99 107
 Cys Lys Val 1 Asn 2 Ile 3 Lys 4 Asp 5 Arg 6 Asn 7 Ile 8 Asp 9 Asn 10
 4 12 20 28 36 44 52 60 68 76 84 92 100 108
 Phe 11 Lys Arg 13 Asp 15 Asp 17 Cys 19 Lys 21 Ile 23 Asn 25 Cys
 5 13 21 29 37 45 53 61 69 77 85 93 101 109
 Asp 22 Lys 24 Asp 26 Lys 28 Lys 30 Lys 32 Lys 34 Lys 36 Lys 38 Lys 40
 6 14 22 30 38 46 54 62 70 78 86 94 102 110
 7 15 23 31 39 47 55 63 71 79 87 95 103 111
 8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 88 96 104
 9 17 25 33 41 49 57 65 73 81 89 97 105 113
 10 18 26 34 42 50 58 66 74 82 90 98 106
 11 19 27 35 43 51 59 67 75 83 91 99 107
 12 20 28 36 44 52 60 68 76 84 92 100 108
 13 21 29 37 45 53 61 69 77 85 93 101 109
 14 22 30 38 46 54 62 70 78 86 94 102 110
 15 23 31 39 47 55 63 71 79 87 95 103 111
 16 24 32 40 48 56 64 72 80 88 96 104
 17 25 33 41 49 57 65 73 81 89 97 105 113
 18 26 34 42 50 58 66 74 82 90 98 106
 19 27 35 43 51 59 67 75 83 91 99 107
 20 28 36 44 52 60 68 76 84 92 100 108
 21 29 37 45 53 61 69 77 85 93 101 109
 22 30 38 46 54 62 70 78 86 94 102 110
 23 31 39 47 55 63 71 79 87 95 103 111
 24 32 40 48 56 64 72 80 88 96 104
 25 33 41 49 57 65 73 81 89 97 105 113
 26 34 42 50 58 66 74 82 90 98 106
 27 35 43 51 59 67 75 83 91 99 107
 28 36 44 52 60 68 76 84 92 100 108
 29 37 45 53 61 69 77 85 93 101 109
 30 38 46 54 62 70 78 86 94 102 110
 31 39 47 55 63 71 79 87 95 103 111
 32 40 48 56 64 72 80 88 96 104
 33 41 49 57 65 73 81 89 97 105 113
 34 42 50 58 66 74 82 90 98 106
 35 43 51 59 67 75 83 91 99 107
 36 44 52 60 68 76 84 92 100 108
 37 45 53 61 69 77 85 93 101 109
 38 46 54 62 70 78 86 94 102 110
 39 47 55 63 71 79 87 95 103 111
 40 48 56 64 72 80 88 96 104
 41 49 57 65 73 81 89 97 105 113
 42 50 58 66 74 82 90 98 106
 43 51 59 67 75 83 91 99 107
 44 52 60 68 76 84 92 100 108
 45 53 61 69 77 85 93 101 109
 46 54 62 70 78 86 94 102 110
 47 55 63 71 79 87 95 103 111
 48 56 64 72 80 88 96 104
 49 57 65 73 81 89 97 105 113
 50 58 66 74 82 90 98 106
 51 59 67 75 83 91 99 107
 52 60 68 76 84 92 100 108
 53 61 69 77 85 93 101 109
 54 62 70 78 86 94 102 110
 55 63 71 79 87 95 103 111
 56 64 72 80 88 96 104
 57 65 73 81 89 97 105 113
 58 66 74 82 90 98 106
 59 67 75 83 91 99 107
 60 68 76 84 92 100 108
 61 69 77 85 93 101 109
 62 70 78 86 94 102 110
 63 71 79 87 95 103 111
 64 72 80 88 96 104
 65 73 81 89 97 105 113
 66 74 82 90 98 106
 67 75 83 91 99 107
 68 76 84 92 100 108
 69 77 85 93 101 109
 70 78 86 94 102 110
 71 79 87 95 103 111
 72 80 88 96 104
 73 81 89 97 105 113
 74 82 90 98 106
 75 83 91 99 107
 76 84 92 100 108
 77 85 93 101 109
 78 86 94 102 110
 79 87 95 103 111
 80 88 96 104
 81 89 97 105 113
 82 90 98 106
 83 91 99 107
 84 92 100 108
 85 93 101 109
 86 94 102 110
 87 95 103 111
 88 96 104
 89 97 105 113
 90 98 106
 91 99 107
 92 100 108
 93 101 109
 94 102 110
 95 103 111
 96 104
 97 105 113
 98 106
 99 107
 100 108
 101 109
 102 110
 103 111
 104 113
 105 113
 106 113
 107 113
 108 113
 109 113
 110 113
 111 113
 112 113
 113 113
 114 113
 115 113
 116 113
 117 113
 118 113
 119 113
 120 113
 121 113
 122 113
 123 113
 124 113
 125 113
 126 113
 127 113
 128 113
 129 113
 130 113
 131 113
 132 113
 133 113
 134 113
 135 113
 136 113
 137 113
 138 113
 139 113
 140 113
 141 113
 142 113
 143 113
 144 113
 145 113
 146 113
 147 113
 148 113
 149 113
 150 113
 151 113
 152 113
 153 113
 154 113
 155 113
 156 113
 157 113
 158 113
 159 113
 160 113
 161 113
 162 113
 163 113
 164 113
 165 113
 166 113
 167 113
 168 113
 169 113
 170 113
 171 113
 172 113
 173 113
 174 113
 175 113
 176 113
 177 113
 178 113
 179 113
 180 113
 181 113
 182 113
 183 113
 184 113
 185 113
 186 113
 187 113
 188 113
 189 113
 190 113
 191 113
 192 113
 193 113
 194 113
 195 113
 196 113
 197 113
 198 113
 199 113
 200 113
 201 113
 202 113
 203 113
 204 113
 205 113
 206 113
 207 113
 208 113
 209 113
 210 113
 211 113
 212 113
 213 113
 214 113
 215 113
 216 113
 217 113
 218 113
 219 113
 220 113
 221 113
 222 113
 223 113
 224 113
 225 113
 226 113
 227 113
 228 113
 229 113
 230 113
 231 113
 232 113
 233 113
 234 113
 235 113
 236 113
 237 113
 238 113
 239 113
 240 113
 241 113
 242 113
 243 113
 244 113
 245 113
 246 113
 247 113
 248 113
 249 113
 250 113
 251 113
 252 113
 253 113
 254 113
 255 113
 256 113
 257 113
 258 113
 259 113
 260 113
 261 113
 262 113
 263 113
 264 113
 265 113
 266 113
 267 113
 268 113
 269 113
 270 113
 271 113
 272 113
 273 113
 274 113
 275 113
 276 113
 277 113
 278 113
 279 113
 280 113
 281 113
 282 113
 283 113
 284 113
 285 113
 286 113
 287 113
 288 113
 289 113
 290 113
 291 113
 292 113
 293 113
 294 113
 295 113
 296 113
 297 113
 298 113
 299 113
 300 113
 301 113
 302 113
 303 113
 304 113
 305 113
 306 113
 307 113
 308 113
 309 113
 310 113
 311 113
 312 113
 313 113
 314 113
 315 113
 316 113
 317 113
 318 113
 319 113
 320 113
 321 113
 322 113
 323 113
 324 113
 325 113
 326 113
 327 113
 328 113
 329 113
 330 113
 331 113
 332 113
 333 113
 334 113
 335 113
 336 113
 337 113
 338 113
 339 113
 340 113
 341 113
 342 113
 343 113
 344 113
 345 113
 346 113
 347 113
 348 113
 349 113
 350 113
 351 113
 352 113
 353 113
 354 113
 355 113
 356 113
 357 113
 358 113
 359 113
 360 113
 361 113
 362 113
 363 113
 364 113
 365 113
 366 113
 367 113
 368 113
 369 113
 370 113
 371 113
 372 113
 373 113
 374 113
 375 113
 376 113
 377 113
 378 113
 379 113
 380 113
 381 113
 382 113
 383 113
 384 113
 385 113
 386 113
 387 113
 388 113
 389 113
 390 113
 391 113
 392 113
 393 113
 394 113
 395 113
 396 113
 397 113
 398 113
 399 113
 400 113
 401 113
 402 113
 403 113
 404 113
 405 113
 406 113
 407 113
 408 113
 409 113
 410 113
 411 113
 412 113
 413 113
 414 113
 415 113
 416 113
 417 113
 418 113
 419 113
 420 113
 421 113
 422 113
 423 113
 424 113
 425 113
 426 113
 427 113
 428 113
 429 113
 430 113
 431 113
 432 113
 433 113
 434 113
 435 113
 436 113
 437 113
 438 113
 439 113
 440 113
 441 113
 442 113
 443 113
 444 113
 445 113
 446 113
 447 113
 448 113
 449 113
 450 113
 451 113
 452 113
 453 113
 454 113
 455 113
 456 113
 457 113
 458 113
 459 113
 460 113
 461 113
 462 113
 463 113
 464 113
 465 113
 466 113
 467 113
 468 113
 469 113
 470 113
 471 113
 472 113
 473 113
 474 113
 475 113
 476 113
 477 113
 478 113
 479 113
 480 113
 481 113
 482 113
 483 113
 484 113
 485 113
 486 113
 487 113
 488 113
 489 113
 490 113
 491 113
 492 113
 493 113
 494 113
 495 113
 496 113
 497 113
 498 113
 499 113
 500 113
 501 113
 502 113
 503 113
 504 113
 505 113
 506 113
 507 113
 508 113
 509 113
 510 113
 511 113
 512 113
 513 113
 514 113
 515 113
 516 113
 517 113
 518 113
 519 113
 520 113
 521 113
 522 113
 523 113
 524 113
 525 113
 526 113
 527 113
 528 113
 529 113
 530 113
 531 113
 532 113
 533 113
 534 113
 535 113
 536 113
 537 113
 538 113
 539 113
 540 113
 541 113
 542 113
 543 113
 544 113
 545 113
 546 113
 547 113
 548 113
 549 113
 550 113
 551 113
 552 113
 553 113
 554 113
 555 113
 556 113
 557 113
 558 113
 559 113
 560 113
 561 113
 562 113
 563 113
 564 113
 565 113
 566 113
 567 113
 568 113
 569 113
 570 113
 571 113
 572 113
 573 113
 574 113
 575 113
 576 113
 577 113
 578 113
 579 113
 580 113
 581 113
 582 113
 583 113
 584 113
 585 113
 586 113
 587 113
 588 113
 589 113
 590 113
 591 113
 592 113
 593 113
 594 113
 595 113
 596 113
 597 113
 598 113
 599 113
 600 113
 601 113
 602 113
 603 113
 604 113
 605 113
 606 113
 607 113
 608 113
 609 113
 610 113
 611 113
 612 113
 613 113
 614 113
 615 113
 616 113
 617 113
 618 113
 619 113
 620 113
 621 113
 622 113
 623 113
 624 113
 625 113
 626 113
 627 113
 628 113
 629 113
 630 113
 631 113
 632 113
 633 113
 634 113
 635 113
 636 113
 637 113
 638 113
 639 113
 640 113
 641 113
 642 113
 643 113
 644 113
 645 113
 646 113
 647 113
 648 113
 649 113
 650 113
 651 113
 652 113
 653 113
 654 113
 655 113
 656 113
 657 113
 658 113
 659 113
 660 113
 661 113
 662 113
 663 113
 664 113
 665 113
 666 113
 667 113
 668 113
 669 113
 670 113
 671 113
 672 113
 673 113
 674 113
 675 113
 676 113
 677 113
 678 113
 679 113
 680 113
 681 113
 682 113
 683 113
 684 113
 685 113
 686 113
 687 113
 688 113
 689 113
 690 113
 691 113
 692 113
 693 113
 694 113
 695 113
 696 113
 697 113
 698 113
 699 113
 700 113
 701 113
 702 113
 703 113
 704 113
 705 113
 706 113
 707 113
 708 113
 709 113
 710 113
 711 113
 712 113
 713 113
 714 113
 715 113
 716 113
 717 113
 718 113
 719 113
 720 113
 721 113
 722 113
 723 113
 724 113
 725 113
 726 113
 727 113
 728 113
 729 113
 730 113
 731 113
 732 113
 733 113
 734 113
 735 113
 736 113
 737 113
 738 113
 739 113
 740 113
 741 113
 742 113
 743 113
 744 113
 745 113
 746 113
 747 113
 748 113
 749 113
 750 113
 751 11

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(20) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-196873

(43)公開日 平成11年(1999)7月27日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 12 N 15/09	ZNA	C 12 N 15/09
A 61 K 37/027		A 61 K 37/027
A 61 K 39/30		A 61 K 39/395
39/395	AED	45/00
45/00	ABE	48/00

審査請求 未請求 請求項の数41 FD 外国語出願 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-360757

(32)出願日 平成9年(1997)12月9日

(71)出願人 591002957

スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ
ションSMITHKLINE BEECHAM
CORPORATIONアメリカ合衆国ペンシルベニア州19406-
0939、キング・オブ・ブルシア、スウェー
ドランド・ロード709番

(72)発明者 ピーター・コーロン・マクドナル

アメリカ合衆国19027/ペンシルベニア州エ
ルキンズ・パーク、チュルップホッケン・ア
ベニュー8311番

(74)代理人 弁理士 青山 茂 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 薬剤結合蛋白

(57)【要約】

【課題】 サイトカイン抑制抗炎薬 (CSAID) 結合タンパク質 (CSBP), そのタンパク質をコードする遺伝子およびこの薬理学的クラスの薬物の評価および特徴付けに有用なアッセイおよびスクリーンが望まれている。

【解決手段】 本発明は、 (a) 配列番号2のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも75%の同一性を有するポリヌクレオチド; (b) 遺伝暗号の重複性により、配列番号2と同じアミノ酸をコードするポリヌクレオチド; (c) (a) または (b) のポリヌクレオチドに対して相補性のポリヌクレオチド; および (d) (a), (b) または (c) のポリヌクレオチドの少なくとも連続した15塙基からなる単離ポリヌクレオチドからなる群より選択されるメンバからなる単離ポリヌクレオチドを提供するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号3のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするポリスクレオチドに対して少なくとも75%の同一性を有するポリスクレオチド；

(b) 遺伝暗号の重複性により、配列番号2と同じアミノ酸をコードするポリアタレオチド；

(c) (a)または(b)のポリスクレオチドに対して相補性のポリスクレオチド；および

(d) (a), (b)または(c)のポリスクレオチドの少なくとも連続した15塩基からなるポリスクレオチドからなる群より選択されるメンバーからなる単離ポリスクレオチド。

【請求項2】 ポリスクレオチドがDNAである請求項1記載のポリスクレオチド。

【請求項3】 ポリスクレオチドがRNAである請求項1記載のポリスクレオチド。

【請求項4】 配列番号1に示されるヌクレオチドからなる請求項2記載のポリスクレオチド。

【請求項5】 配列番号1に示されるヌクレオチド1-1838からなる請求項2記載のポリスクレオチド。

【請求項6】 配列番号2のアミノ酸からなるポリペプチドをコードする請求項2記載のポリスクレオチド。

【請求項7】 請求項2記載のDNAからなるベクター。

【請求項8】 請求項7記載のベクターからなる宿主細胞。

【請求項9】 請求項8記載の宿主細胞からそのDNAによってコードされるポリペプチドを発現させることを特徴とするポリペプチドの製造法。

【請求項10】 ポリペプチドを発現する細胞の製造法であって、細胞がベクター中に含まれるヒトのDNAによりコードされるポリペプチドを発現するように、該細胞を請求項7に記載のベクターで形質転換またはトランスフェクションすることからなる方法。

【請求項11】 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項12】 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項13】 請求項11記載のポリペプチドに対するアゴニスト。

【請求項14】 請求項11記載のポリペプチドに対する抗体。

【請求項15】 請求項11記載のポリペプチドに対するアンタゴニスト。

【請求項16】 CSBP β を必要とする患者の治療方法であって、請求項11記載のポリペプチドの治療上有効量を該患者に投与することからなる治療方法。

【請求項17】 ポリペプチドをコードするDNAを患者に付与し、インビボにて該ポリペプチドを発現させる

ことにより、該ポリペプチドの治療上有効量を投与することからなる請求項16記載の方法。

【請求項18】 CSBP β ポリペプチドを必要とする患者の治療方法であって、請求項16記載のアンタゴニストの治療上有効量を該患者に投与することからなる方法。

【請求項19】 請求項11に記載のポリペプチドの発現に関与する疾患または該疾患に対する罹病性の診断方法であって、該ポリペプチドをコードする核酸配列における変異を測定することからなる方法。

【請求項20】 宿主から出来たサンプル中の請求項11記載のポリペプチドの存在について分析することからなる診断方法。

【請求項21】 請求項11記載のポリペプチドに対するレセプターに結合し、そのレセプターを活性化または賦活する化合物を診断する方法であって、

a. 細胞表面に該ポリペプチドに対するレセプター（化合物の該レセプターへの結合に応じて、検出可能なシグナルを発することのできる第2成分と関与する）を発現する細胞を、該レセプターへの結合を可能とする条件下でスクリーンすべき化合物と接触させ；

b. 該化合物とレセプターとの相互反応より生じるシグナルの有無を検出することにより、該化合物がレセプターに結合し、そのレセプターを活性化するか阻害するかどうかを測定することからなる方法。

【請求項22】 化合物をCSBP β と同定する方法であって、

a. 分析的に検出可能な試薬で標識化した既知のCSAIDを、CSAID/CSBP β 複合体を形成するのに十分な条件下で、CSBP β と接触させ；

b. 該複合体を同定すべき化合物を有してなる試料と接触させ；および

c. その複合体中の標識化CSAIDの量を変える該化合物の能力を検出することにより、該化合物をCSAIDと同定することからなる方法。

【請求項23】 CSBP β が全細胞、サイトソル細胞フラクション、膜細胞フラクションからなる群より選択される形態であり、精製または一部精製された形態である請求項22記載の方法。

【請求項24】 化合物をCSAIDと同定する方法であって、

a. 可溶性サイトソルフラクションをCSBP β を発現する細胞より形成させ；

b. 該フラクションを、CSAID/CSBP β 複合体を形成するのに十分な条件下で、分析的に検出可能な試薬で標識化したCSAIDと接触させ；

c. 該複合体をCSAIDを含有する試料と接触させ；および

c. 標識化CSAID/CSBP β 複合体中の試薬の減少量を測定することにより、CSAIDと検出すること

からなる方法。

【請求項2-6】 細胞がヒト单球である請求項2-4記載の方法。

【請求項2-6】 細胞が組織又宿主細胞である請求項2-4記載の方法。

【請求項2-7】 試薬が放射性標識である請求項2-4記載の方法。

【請求項2-8】 CSBP β との結合能を有するリガンドの同定法であつて、

a. CSBP β を発現する組織又宿主細胞を、結合を可能とする条件下で同定すべきリガンドと接触させ；および

b. リガンド結合タンパク質の存在を検出することからなる方法。

【請求項2-9】 組織又宿主細胞がその細胞表面でCSBP β を発現する請求項2-8記載の方法。

【請求項2-10】 タンパク質またはタンパク質含有の液体フラクションを、同定すべきリガンドと接触させる前に細胞より単離する請求項2-8記載の方法。

【請求項3-1】 請求項2-2記載の方法により同定されるアンタゴニストまたはアゴニスト化合物。

【請求項3-2】 請求項2-2記載の方法により同定される化合物と、医薬上許容される組体とからなる医薬組成物。

【請求項3-3】 請求項1記載のDNAを、そのいずれかの領域にて発現する能力を有するヒト以外のトランスフェニック哺乳動物。

【請求項3-4】 ヒトCSBP β に結合する化合物を同定するためのそれら化合物のスクリーニング方法であつて：

a. CSBP β 領域および結合タンパク質／リガンド結合インジケーター領域を有する融合タンパク質を、CSBP β 領域との結合を可能とする条件下で複数の化合物と接触させ；および

b. そのタンパク質／リガンド結合インジケーター領域の活性を強化または阻害する能力を有する候補薬剤を同定することからなる方法。

【請求項3-5】 ヒトCSBP β と結合し、そのキナーゼ活性を阻害する化合物を同定するためのそれら化合物のスクリーニング方法であつて：

a. CSBP β を、CSBP β との結合を可能とする条件下で複数の化合物と接触させ；および

b. CSBP β のキナーゼ活性を強化または阻害する能力を有する候補薬剤を同定することからなる方法。

【請求項3-6】 ヒトCSBP β と結合し、そのキナーゼ活性の活性化を阻害する化合物を同定するためのそれら化合物のスクリーニング方法であつて：

a. CSBP β を、CSBP β との結合を可能とする条件下で複数の化合物と接触させ；および

b. CSBP β のキナーゼ活性の活性化を強化または阻

害する能力を有する候補薬剤を同定することからなる方法。

【請求項3-7】 サイトカイン介在の炎症疾患の治療法であつて、CSBP β -阻害のCSAIDをその治療を必要とする患者に投与することからなる方法。

【請求項3-8】 患者が、SDAT、MS、脳性マラリア、発作、脳外傷、脊髄損傷、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、ARDS、RA、OA、IBD、乾燥、皮膚炎、喘息、骨粗鬆症、敗血症、慢性腎不全、移植片拒絶反応、狼瘍、移植片対宿主疾患、AIDSおよびカベキシーからなる群より選択される請求項3-5記載の方法。

【請求項3-9】 CSAIDがCSBP β のキナーゼ活性を阻害する請求項3-5記載の方法。

【請求項4-0】 CSAIDがCSBP β とその基質との結合を阻害する請求項3-5記載の方法。

【請求項4-1】 CSBP β のキナーゼ活性および／またはCSBP β とその基質との結合を阻害することにより機能するCSAID。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、1993年9月17日出願の米国特許出願番号08/123175の一部継続出願である、1994年5月31日出願の米国特許出願番号08/250975の一部継続出願である、1995年6月6日出願の米国特許出願番号08/468902の一部継続出願である。

【0002】

【発明の属する技術分野】本発明は、とりわけ、薬剤結合タンパク質、そのタンパク質をコードする遺伝子、および医薬をスクリーニングするためのアッセイおよび方法に関する。さらに詳しくは、本発明はサイトカイン抑制抗炎症薬(Cytokine Suppressive Anti-Inflammatory Drug(CSAID))結合タンパク質(CSBP β)、そのタンパク質をコードする遺伝子およびこの薬理学的クラスの薬物の評価および特徴付けに有用なアッセイおよびスクリーニングに関する。

【0003】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】サイトカインは炎症および他の免疫機能の間の細胞応答を制御するにおいて重要な役割を果たす。特に興味のあるサイトカインは、インターロイキン-1(IL-1 α および β)および腫瘍壞死因子(TNF α および β)であり、それは炎症応答カスケードの初期工程に關与する細胞内タンパク質である(Araiら、Am. Rev. Biochem. 59:783-836(1990))。かくして、最近では、炎症性刺激に応答するIL-1 α およびTNFの産生を妨げようとする研究が実質的な範囲でなされている。ある治療方法は、細胞および／または翻訳および／または分泌のレベルでIL-1 α およびTNFの産生を抑制するものである。ある種のピリジニルイミダゾールに關与する活性

は、「C S A I D」またはCytokine Suppressing Anti-Inflammatory Drugsと称される一連の化合物に通じる。軽等ではより小さな作用が観察され、他の工程での作用も除外できないが、これらの化合物は翻訳レベルで優先的にI L-1およびT N F の発現を阻止するようである。

【0004】ビリジニルイミダゾール、5-(4-ビリジル)-6-(4-フルオロフェニル)-2,3-ジヒドロイミダゾ(2,1- α)チアゾール(S K & F 8-6002)は原型C S A I Dと同定された。その活性についての基本事項は確立され、特徴付けられている(Ledda, Int'l J Immunopharmac. 10 (7) : 825-843 (1988); Agents and Actions 27 (3/4) : 277-279 (1989) およびInt'l J Immunother. 6 (1) : 1-12 (1990))。S ARの研究は、ビリジニルイミダゾールのサイトカイン抑制作用が、エイコサノイドおよびヨコトリエン産生に対するその阻害作用とは独立した、独特な活性を示すことを示唆する。実質的にC S A I Dが新規な抗炎症治療剤である可能性があるため、分子レベルでの作用機構を特徴付けること、ならびに高度な選択性および効能を有する化合物を得ることは非常に重要なことである。詳細には、C S A I D分子標的の同定および特徴付けは、炎症に関与する生物学的工程の理解を深め、さらに強力な抗炎症薬の設計およびスクリーニングを助けるであろう。本発明は、とりわけ、さらなるC S A I D結合タンパク質(C S B P)の精製および特徴付けを顯示する。

【0005】

【課題を解決するための手段】本明細書に顯示されている特定の配列などの、本発明のDNAは、そのDNAが新規なC S B P β の発現に必要な遺伝的情報をコードする点で有用である。加えて、該配列はC S B P β 科の別のメンバを単離し、同定するためのプローブとして用いてもよく、ならびにC S B P β 遺伝子の非古典的発現により特徴付けられる病態のアシセンス療法の基礎を形成する。新規なタンパク質それ自体は、直接、治療剤または診断剤として、ならびにC S A I D結合活性のアンタゴニストまたはアゴニストである化合物に対するスクリーニング系の成分として有用である。該タンパク質はまた、異種の種における抗体産生を惹起するのに有用であり、その抗体は前記した診断、治療およびスクリーニングに用いるのに有用である。本明細書に記載の試薬に関するこれらの使用および他の使用は、この明細書を読みことにより当業者に明らかとなるであろう。

【0006】

【発明の実施の形態】図1ないし3に示されるポリスクリオチドなどの本明細書に示す情報を用いると、C S B P β をコードする本発明のポリスクリオチドは、出来物質としての精製およびT細胞からのm RNAを用いてc DNAをクローニングする方法などの、標準的クロ-

ーニングおよびスクリーニング法を用いて得ることができる。本発明の代表例である、図1ないし3に示されるポリスクリオチドの部分フラグメントは、発現配列タグ(E S T)分析を用いてヒト精巣の細胞から由来のc DNAライブラリーにて見つけた(Adams, M. D. ら, Science 252 : 1651-1656 (1991); Adams, M. D. ら, Nature, 355 : 632-634 (1992); Adams, M. D. ら, Nature, 377 Suppl. 3-174 (1996))。その後、図1ないし3の配列に対応し、表示されるようなタンパク質翻訳のための読み枠を有する長いc DNAを、新生化T細胞ライブラリーより標準的クローニングおよびスクリーニング操作を用いるハイブリダイゼーションを介してクローニングした。本発明のC S B P β は、構造的に、C S B P科の他のタンパク質に関連付けられる。本発明のC S B P β をコードするスクリオチド配列は、MAPキナーゼ科の他のヒトメンバーと、その全体において、約58-73%の同一性を有する。

【0007】本発明のポリスクリオチドは、m RNAのごときRNAの形態であってもよく、あるいは、例えばクローニングにより得られるか、または化学合成法もしくはその組み合わせにより產生されるc DNAおよびゲノムDNAを含め、DNAの形態であってもよい。DNAは2本鎖または1本鎖であってもよい。1本鎖DNAはセンス鎖としても知られているコーディング鎖であってもよく、または、アンチセンス鎖とも称される非コーディング鎖であってもよい。ポリペプチドをコードするコーディング配列は、図1ないし3(配列番号1)に示されるポリスクリオチドのコーディング配列と同じであってもよい。そのコーディング配列はまた、遠近端の重複性(縦重性)の結果として、図1ないし3(配列番号2)のポリペプチドをもコードする、別の配列を有するポリスクリオチドであってもよい。

【0008】図1ないし3(配列番号2)のポリペプチドをコードする本発明のポリスクリオチドは、成熟ポリペプチド用のコーディング配列自体；成熟ポリペプチド用のコーディング配列および付加的なコーディング配列、例えば、ブレー。ブローまたはフレプロータンパク質配列などのリーダー配列または分泌配列をコードする配列；および前記した付加的なコーディング配列を有するか、または有することなく、例えば、限定されるものではないが、転写およびスプライシングを含め、m RNAプロセッシングにて後制を果たす、転写かつ非翻訳の配列および、例えば、m RNAのリボソーム結合および安定性のためのポリアデニル化シグナルなどのイントロンおよび非コーディング5'および3'配列を包含する付加的な非コーディング配列を有する成熟ポリペプチドのコーディング配列を包含するが、これに限定されるものではない。付加的な官能基を付与するコーディング配列をポリペプチドに組み入れてもよい。かくして、例えば、ポリペプチドを、融合ポリペプチドの精製を容易に

する、ペプチドなどのマーカー配列に融合させてもよい。本発明のこの態様の特定の好ましい具体例において、マーカー配列は、pQEベクター (Qiagen, Inc.) で供給されるタグなどのヘキサヒスチジンペプチドである。Gentzら、Proc Natl Acad Sci USA, 86 : 821-824

(1989) に記載されているように、例えば、ヘキサヒスチジンは融合タンパク質を精製するのに都合がよい。別の具体例において、マーカー配列はHAタグである。そのHAタグはインフルエンザ・赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応するものであり、例えば、Wils onら、Cell 37 : 767 (1984) に記載されている。他の多くのそのようなタグが市販されている。

【0009】前記によれば、本明細書にて用いられる「ポリペプチドをコードするポリスクレオチド」なる語はまた、コーディングおよび/または非コーディング配列を含んでいてもよい、付加的な領域と共に、該ポリペプチドをコードする单一の連続領域または不連続領域

(例えば、イントロンにより分断されている) を含むポリスクレオチドも包含する。さらに本発明は、図1ないし3 (配列番号2) の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメント、アナログおよび誘導体をコードするポリスクレオチドの変種に關する。ポリスクレオチドの変種は、天然の対立遺伝子変種などの天然に存在する変種であってもよい、あるいは、天然に存在することが知られていない変種であってもよい。かかるポリスクレオチドの天然に存在しない変種は、ポリスクレオチド、細胞または生物に用いる方法を含め、突然変異誘発法により製造してもよい。

【0010】この点で変種には、スクレオチド置換、欠失または付加により前記したポリスクレオチドと異なる変種がある。置換、欠失または付加には1個またはそれ以上のスクレオチドが関与しているかもしれない。変種は、コーディング配列または非コーディング配列あるいはこれらの両方において変化していてもよい。コーディング配列の変化により、何れかまたは非同義アミノ酸置換、欠失または付加が生じてもよい。この点で本発明の特に好ましい具体例には、図1ないし3 (配列番号2) に示されるCSBP β のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリスクレオチド；その変種、アナログ、誘導体およびフラグメント、ならびにその変種、アナログおよび誘導体のフラグメントがある。

【0011】さらには、数個、わずかな、5ないし10、1ないし5、1ないし3、2、1個または0個のアミノ酸残基が、いずれかの組み合わせで置換、欠失または付加されている、図1ないし3 (配列番号2) のCSBP β ポリペプチドのアミノ酸配列を有する、CSBP β 変種。アナログ、誘導体およびフラグメント、ならびにそのフラグメントの変種、アナログおよび誘導体をコードするポリスクレオチドが特に好ましい。これらのうち特に好ましいのは、CSBP β の特性および活性を変

化させないサイレント置換、付加および欠失である。またこの点において、同義置換が特に好ましい。置換されていない、図1ないし3 (配列番号2) のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリスクレオチドが最も好ましい。

【0012】本発明のさらに好ましい具体例は、図1ないし3に示されるアミノ酸配列を有するCSBP β ポリペプチドをコードするポリスクレオチドに対して少なくとも75%の同一性を有するポリスクレオチド、およびかかるポリスクレオチドに相補的なポリスクレオチドである。密結クローニングのヒトcDNAのCSBP β ポリペプチドをコードするポリスクレオチドおよびそれに相補的なポリスクレオチドに対して少なくとも80%同一である領域からなるポリスクレオチドが非常に好ましい。この点において、そのポリペプチドに対して少なくとも90%同一であるポリスクレオチドが特に好ましく、特に好ましいのは、少なくとも95%同一のものである。さらには、少なくとも97%同一のものが非常に好ましく、少なくとも98-99%同一のものがさらに好ましく、少なくとも99%同一のものが最も好ましい。この点において、さらに特に好ましい具体例は、図1ないし3 (配列番号2) のcDNAによりコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性を保持しているポリペプチドをコードしているポリスクレオチドである。

【0013】本発明はさらに本発明のポリペプチドをコードするポリスクレオチドとハイブリッド形成するポリスクレオチドに関する。この点において、本発明は、特に、ストリンジェントな条件下、本明細書にて前記したポリスクレオチドとハイブリッド形成するポリスクレオチド下に關する。本明細書にて用いる「ストリンジェントな条件」なる語は、ハイブリッド形成が、配列間で少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%同一である場合にのみ生じることを意味する。本発明のポリスクレオチドは、成熟タンパク質に、付加的なアミノまたはカルボキシ末端アミノ酸が加わるか、成熟ポリペプチドの内部にアミノ酸が加わった(例えば、成熟形態が一つ以上のポリペプチド鎖を有する場合) ポリペプチドをコードすることができる。このような配列は、とりわけ、前駆体から成熟形態へのタンパク質のプロセッシングにおいて役割を果たし、タンパク質を運ぶことを容易にし、タンパク質の半導期を長くしたり、短くしたり、あるいはアッセイまたは生産のためのタンパク質の操作を容易にすることができる。インシテューで一般的なように、該付加アミノ酸は細胞酵素により成熟タンパク質からプロセッシングにより除かれる。

【0014】一またはそれ以上のプロ配列に融合したポリペプチドの成熟形態を有する前駆体タンパク質は該ポリペプチドの不活性形でもよい。プロ配列が除かれるると、そのような不活性前駆体は一般に活性化される。ブ

プロ配列の幾らかまたは全体を、活性化の前に除去できる。一般に、そのような前駆体はプロタンパク質と呼ばれる。経て、本発明のポリヌクレオチドは成熟タンパク質、リーダー配列の加わった成熟タンパク質（プレタンパク質とも称される）、プレタンパク質のリーダー配列ではない¹またはそれ以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体。またはリーダー配列と、一般に、ポリペプチドの活性な成熟形態を生成するプロセッシング工程の間に除去される¹またはそれ以上のプロ配列を有するプロタンパク質の前駆体であるプレプロタンパク質をコードする。

【0015】ポリペプチド

本発明は、さらに図1ないし3（配列番号2）の推定アミノ酸配列を有するCSBPβポリペプチドに関する。本発明はまた、これらのポリペプチドのフラグメント、アナログおよび誘導体にも関する。「フラグメント」、「誘導体」および「アナログ」なる語は、図1ないし3のポリペプチドについて言う場合、かかるポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性を保持している、すなわち、CSBPβとして機能するポリペプチド、または、たとえそのポリペプチドがCSBPβとして機能しなくともそのリガンドまたは結合分子に結合する能力を保持している、ポリペプチドを意味する。かくして、アナログは、例えば、プロタンパク質部分の側鎖により活性化され、活性成熟ポリペプチドを產生しうるプロタンパク質を包含する。本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然ポリペプチドまたは合成ポリペプチドであってよい。特定の好みしい具体例において、本発明のポリペプチドは組換えポリペプチドである。

【0016】図1ないし3（配列番号2）のポリペプチドのフラグメント、誘導体またはアナログは、（1）1個またはそれ以上のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基（好みしくは、保存アミノ酸残基）で置換されており、かかる置換アミノ酸残基は遺伝暗号によりコードされているものであっても、なくてもよいもの；

（1-i）1個またはそれ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの；（1-ii）成熟ポリペプチドが別の化合物、例えば、ポリペプチドの半胱基を増加させる化合物（例えば、ポリエチレンジリコール）と融合しているもの；または（1-v）リーダーもしくは分泌配列または成熟ポリペプチドの精製用に利用される配列またはプロタンパク質配列などの、付加的なアミノ酸が成熟ポリペプチドに融合しているものであってよい。かかるフラグメント、誘導体およびアナログは、本明細書の教示から当業者に自明であると考えられる。この点において、本発明の特に好みしい具体例には、図1ないし3（配列番号2）に示されるCSBPβのアミノ酸配列を有するポリペプチド、その変種、アナログ、誘導体およびフラグメント、ならびにCSBPβ結合活性/CSBPβの機能を保持しているフラグメントの変種、アナログおよび誘導体である。

【0017】さらにこの点において特に好みしいのは、優制、わずかな、5ないし10、1ないし5、1ないし3、2、1個または0個のアミノ酸残基が、いずれかの組み合わせで置換、欠失または付加されている、図1ないし3のCSBPβポリペプチドのアミノ酸配列を有する変種、アナログ、誘導体およびフラグメント、ならびに該フラグメントの変種、アナログおよび誘導体である。これらのうち特に好みしいのは、CSBPβの性質および活性を変化させないサイレント置換、付加および欠失である。またこの点において、同型置換が特に好みしい。最も好みしいのは、置換されていない図1ないし3のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0018】本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、好みしくは、単離形態にて提供され、好みしくは、等質性になるまで精製される。本発明のポリペプチドは、配列番号2のポリペプチド（詳細には成熟ポリペプチド）、ならびに配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも80%の同一性を有し、より好みしくは配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも90%の類似性（より好みしくは少なくとも90%の同一性）を有し、さらにより好みしくは配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも95%の類似性（さらにより好みしくは少なくとも95%の同一性）を有するポリペプチドを包含する。また、一般に、少なくとも30個のアミノ酸、好みしくは少なくとも50個のアミノ酸を含有するポリペプチドの部分を有するそのようなポリペプチドの部分を有する。

【0019】ポリペプチドフラグメント

本発明のポリペプチドのフラグメントまたは部分を、ペプチド合成により対応する完全長のポリペプチドの製造に使用してもよい；従って、フラグメントを完全長のポリペプチドの製造のための中間体として使用してもよい。本発明のポリヌクレオチドのフラグメントまたは部分を用いて本発明の完全長のポリヌクレオチドを合成してもよい。フラグメントは、「自立している」、すなわち、他のアミノ酸またはポリペプチドの一部でなく、または、それらに融合しておらず、あるいは、かかるフラグメントが大きなポリペプチド中に含まれていてその一部分または領域となっていてもよい。大きなポリペプチド中に含まれている場合、このフラグメントは、最も好みしくは单一の連続した領域を形成する。しかしながら、いくつかのフラグメントが、单一のより大きなポリペプチド中に含まれていてもよい。例えば、特定の好みしい具体例は、宿主中の発現のために設計された前駆

体ポリペプチド中に含まれていて、C S B P β フラグメントのアミノ末端に融合した異種ブレおよびブローポリペプチド領域、および、該フラグメントのカルボキシル末端に融合した付加的な領域を有している。本発明のC S B P β ポリペプチドのフラグメントに関する。従つて、本明細書の意図する1つの態様において、フラグメントは、C S B P β から由来の融合ポリペプチドまたは融合タンパク質の一部または部分をいう。

【0020】本発明のポリペプチドフラグメントの典型例として、長さが約5ないし15個、10ないし20個、15ないし40個、30ないし55個、41ないし75個、41ないし80個、41ないし90個、50ないし100個、75ないし100個、90ないし115個、100ないし125個、および110ないし112個のアミノ酸のものを挙げることができる。この意味において、「約」とは、特に列挙した範囲、ならびに数組、わずかな、5、4、3、2、1個のアミノ酸残基の分だけ大きいまたは小さい範囲であって、上限または下限、あるいはそれらの両方の範囲を包含する。例えば、この意味においては、約40ないし80個のアミノ酸は、40プラスまたはマイナス数個、わずかな、5、4、3、2、1個のアミノ酸残基から、90プラスまたはマイナス数個、わずかな、5、4、3、2、1個のアミノ酸残基までのポリペプチドフラグメントを意味し、すなわち、最大40マイナス数個のアミノ酸から90プラス数個のアミノ酸、最小40プラス数個のアミノ酸から90マイナス数個のアミノ酸の範囲である。この点において好ましくは、上限または下限、あるいはそれらの両方の範囲において、列挙した範囲プラスまたはマイナス5個程度のアミノ酸である。上限または下限、あるいはそれらの両方の範囲において、列挙した範囲プラスまたはマイナス3個程度のアミノ酸が特に非常に好ましい。上限または下限、あるいはそれらの両方の範囲において、列挙した範囲プラスまたはマイナス1個程度のアミノ酸、または列挙した範囲に付加または欠失のないものが特に非常に好ましい。この点において、約5ないし15個、10ないし20個、15ないし40個、30ないし55個、41ないし75個、41ないし80個、41ないし90個、50ないし100個、75ないし100個、90ないし115個、100ないし125個、および110ないし112個のアミノ酸の長さのフラグメントが、すべてのうちで最も好ましい。

【0021】本発明の特に好ましい具体例には、C S B P β の平滑末端の変異体がある。平滑末端の変異体は、アミノ末端を含む連続した一連の残基（すなわち、連続領域、一部または部分）またはカルボキシル末端を含む連続した一連の残基の欠失、あるいは両平滑末端の変異体のような、2つの連続した一連の残基の欠失、すなわち、アミノ末端における欠失およびカルボキシル末端における欠失を除く、図1ないし3（配列番号2）のアミ

ノ酸配列を有するC S B P β ポリペプチド、またはその変種または誘導体を包含する。本発明の接結合レセプターの特に好ましいフラグメントとして、付随するトランスマンプランのない細胞外ドメインからなる可溶形のレセプターが挙げられ、細胞質ドメインまたはトランスマンプラン領域が欠失していることで、細胞外ドメインを細胞質ドメインに直接融合させるレセプターが得られる。する。例えば、PCT公開番号WO94/03620を参照のこと。前記した範囲の大きさを有するフラグメントもまた平滑末端フラグメントの好ましい具体例であり、フラグメントのうちそのフラグメントが特に好ましい。

【0022】本発明のこの態様において、C S B P β の構造的または機能的属性によって特徴づけられるフラグメントも好ましい。この点において本発明の好ましい具体例は、C S B P β のアルファー-ヘリックスおよびアルファ-ヘリックス形成領域（「アルファー領域」）、ベータシートおよびベータシート形成領域（「ベータ領域」）、ターンおよびターン形成領域（「ターン領域」）、コイルおよびコイル形成領域（「コイル領域」）、親水領域、疎水領域、アルファ両親媒性領域、ベータ両親媒性領域、可動性領域、界面形成領域および高抗原性指数領域を含んでなるフラグメントを包含する。

【0023】この点において、非常に好ましい具体例には、いくつかの構造特性、例えば、前記した特性のいくつかを組み合わせたC S B P β の領域からなるものがある。この点において、図1ないし3の約10ないし約20、約40ないし約50、約70ないし約90および約100ないし約112の残基によって限定される領域が特に好ましい領域であり、そのすべては、ターン領域、親水領域、可動性領域、界面形成領域および高抗原性指数領域の高度に特徴的なアミノ酸組成物によって特徴づけられる。かかる領域はより大きなポリペプチド中に含まれていてもよく、あるいは前記のごとくそれら自体本発明の好ましいフラグメントであってもよい。このパラグラフにて用いる「約」なる語は、一般に、フラグメントに關して前記した意味を有することが理解されよう。

【0024】さらに好ましい領域はC S B P β の活性を媒介する領域である。この点において、類似活性または改善された活性を有するものは望ましくない活性の減少したものを受け、C S B P β の化学的、生物学的活性または他の活性を有するフラグメントが最も好ましい。この点において、関連するポリペプチドの活性領域に対して配列または位置、あるいは両方が相同的である領域を含むフラグメントが非常に好ましい。本発明はまた、とりわけ、前記したフラグメントをコードするポリヌクレオチド、該フラグメントをコードするポリヌクレオチドとハイブリッド形成するポリヌクレオチド、特にストリングエントな条件下でハイブリッド形成するも

の、および該フラグメントをコードするポリヌクレオチドを増幅するためのPCRプライマーなどのポリヌクレオチドに関する。これらの点において、好ましいポリヌクレオチドは、前記のような好ましいフラグメントに対応するポリヌクレオチドである。

【0026】ベクター、宿主細胞、発現

本発明のタンパク質は、組換え遺伝子工学技術により製造されるのが好ましい。DNAを遺伝子発現に要求される必須の発現調節領域（例えば、調節領域）に機能的に連結させることにより、単離した核酸、好ましくは、DNAを発現ベクターに導入することができる。ベクターは、当該分野にて周知の方法（Ausubelら、前掲）により、原核生物（例えば、細菌）または真核生物（例えば、酵母または哺乳動物）細胞などの適当な宿主細胞に導入することができる。製造または単離した所望のタンパク質についてのコーディング配列をいずれか適当なベクターまたはレプリコンにクローニングすることができる。多くのクローニングベクターが知られており、問題は適当なクローニングベクターを選択することである。クローニング用組換えDNAベクターおよび該ベクターが形質転換できる宿主細胞は、pAKT101（*E.coli*）、pBR（*E.coli*）、pACYC177（*E.coli*）、pKT230（グラム陰性菌）、pGV1106（グラム陰性菌）、pLAFR1（グラム陰性菌）、pME290（非-*E.coli*グラム陰性菌）、pHV14（*E.coli*およびBacillus subtilis）、pBD9（*Bacillus*）、pU61（*Streptomyces*）、pUC6（*Streptomyces*）、Yip5（Saccharomyces）、ベキュロウイルス昆虫細胞系、YCp19（Saccharomyces）を包含する。一般には、「DNA Cloning」 Vols. I & II, Gloverら編、J R L Press Oxford (1986) (1987) やよ UT Maniatisら、「Molecular Cloning」, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) を参照のこと。

【0026】遺伝子は、所望のタンパク質をコードするDNA配列がこの発現装置を含むベクターにより形質転換される宿主細胞のRNA中に転写されるように、プロモーター、リボソーム結合部位（細菌発現用）および所望によりオペレーター（包括的に本明細書にて「制御（control）」因子と称される）の制御下に置くことができる。コーディング配列はシグナルペプチドまたはリーダー配列を有していてもいなくてもよい。本発明のサブユニット抗原は、例えば、*E.coli* lacZプロモーターまたはタンパク質A遺伝子（sp-a）プロモーターおよびシグナル配列を用いて発現させることができる。リーダー配列は、細菌宿主により翻訳後プロセッシングにより除去することができる。例えば、米国特許第4431739号；第4426437号；第4338397号を参照のこと。

【0027】制御配列に加えて、宿主細胞の増殖に関連してタンパク質配列の発現を調節することができる調節配列を加えることが望ましい。調節配列は当業者に知ら

れており、例えば、調節化合物の存在を含め、化学的または物理的刺激に応答してターンオンまたはオフされるように遺伝子の発現を引き起こすものが挙げられる。別の種の調節因子、例えば、エンハンサー配列もまた、ベクター中にあってもよい。

【0028】発現ベクターは特定のコーディング配列が適当な調節配列を有するベクター中に配置されるよう構成される。コーディング配列が制御配列の「制御」下で転写されるように、制御配列に関してそのコーディング配列を位置付けかつ組向させる（すなわち、制御配列のDNA分子に結合するRNAポリメラーゼがコーディング配列を転写する）。目的とする特定のタンパク質をコードする配列を修飾することがこの目的を達成するのに望ましいかもしれない。例えば、ある場合には、すなわち、読み替を維持するために、適当な配向を有する制御配列に結合するように配列を修飾する必要があるかもしれません。前記したクローニングベクターなどのベクターに挿入する前に、制御配列および他の調節配列をコーディング配列にライゲートすることもできる。別法として、既に制御配列および適当な制限部位を有する発現ベクターに直接的にそのコーディング配列をクローニングさせることもできる。

【0029】ある場合には、ポリペプチドを宿主生物から分泌させ、つづいて分泌シグナルの切断を生じさせる配列を加えることが望ましい。別法として、遺伝子融合を、目的とする結合タンパク質をコードする遺伝子を他の所望の特性を有する蛋白質をコードする遺伝子に融合させることで形成させてもよい。例えば、融合対は、結合タンパク質を選択する別の手段として用いることのできる公知のアッセイ可能な活性（例えば、酵素活性）を付与することができる。結合タンパク質（一般に、サイトゾル成分）を細胞表面に露出タンパク質の形態で表すことができるよう、融合対は細胞表面因子などの構造因子とすることができる。また、その融合対は、特異的抗体および試薬で検出でき、精製の補助剤として作用してもよい。ペプチドまたはタンパク質フラグメントとすることもできる（例えば、His尾部、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合）。目的とするタンパク質の変異体またはアナログを產生することも望ましい。変異体またはアナログは、タンパク質をコードする配列の一部の欠失により、一の配列の挿入により、および/またはその配列内での1またはそれ以上のヌクレオチドの置換により製造できる。部位定向突然変異誘発などのヌクレオチド配列を修飾する技術および融合タンパク質を形成する方法は当業者に周知である。例えば、T. Maniatisら、前掲；DNA Cloning, Vols. I および II, 前掲；Nucleic Acid Hybridization, 前掲を参照のこと。

【0030】多数の原核細胞発現ベクターが当該分野にて知られている。例えば、米国特許第4378355号；第4440859号；第4436815号；第4431740号；第4431739号；第4

428941号；第4425437号；第4418149号；第4411994号；第4366246号；第4342832号を参照；さらに、米国特許出願GR2121054；GB298123；GB2007676；および欧洲特許出願163395を参照のこと。酵母発現ベクターも知られている。例えば、米国特許第4446235号；第4443539号；第4430428号を参照；さらに、欧洲特許出願103409；106561；96491を参照のこと。SV40後期プロモーターを用いて哺乳動物細胞にて発現を起こさせるpSV2neo（J. Mol. Appl. Genet. 1 : 327-341に記載）またはpCDNA1neo、CMVプロモーターを用いて発現を起こさせるpCDNA1より由來のベクター（Mol. Cell. Biol. 7 : 4125-29）。これら後者の2つのベクターを哺乳動物細胞における一時的または安定的（例えば、G418またはヒドロマイシン耐性を用いて）発現に用いることができる。昆虫細胞発現系、例えば、*Drosophila*（例えば、PCT出願US89/05155およびUS91/06838ならびにEP出願88/304093、3を参照のこと）およびバキョウウイルス発現系も有用である。

【0031】選択した発現系および宿主に応じて、前記した発現系により形質転換された宿主細胞を目的とするタンパク質を発現させることで本発明のタンパク質を産生する。ついで、該タンパク質を宿主細胞より単離して精製する。発現系がタンパク質を増殖培地に分泌するならば、タンパク質はその培地より直接精製することができる。タンパク質が分泌されないならば、細胞ライゼートより単離するか、または細胞膜フラクションより回収される。適当な培養条件および回収方法の選択は当業者の範囲内である。

【0032】本発明のタンパク質を同定する別法は、遺伝子ライプラリーを構築し、その得られたクローニングを用いてE. coliを形質転換させ、ブルーし、所望の結合タンパク質に対するポリクローナル血清またはモノクローナル抗体を用いて個々のコロニーをスクリーニングすることによる。本発明のタンパク質はまた、公知アミノ酸配列または目的とする遺伝子のDNA配列から由來のアミノ酸配列を用いて、固相ペプチド合成などの化学生合成により産生することもできる。かかる方法は当業者に知られている。特に、ペプチドの化学生合成は好ましくはない。

【0033】アッセイ本発明はまた、CSBP β に結合することが知られていないリガンドがそのようなタンパク質に結合することができるかどうかを測定する方法を提供するものである。該方法は、同定すべきリガンドを哺乳動物細胞からのサイトゾルフラクションと接触させ、CSA1D結合アッセイ（Leeら、Nature 372 : 739-746；および以前のCSBPファイリング）にて、既知の放射性CSA1Dと結合するその能力を測定することからなる。別法は、同定すべきリガンドを、かかるレセプターに結合すると前に同定されたリガンドと結合する

のに十分な条件下で、CSBP β のコーディング配列を発現する全細胞と接触させることからなる。他の具体例において、細胞膜あるいはCSBP β 結合体または準備した遊離もしくは細胞支持体に固定したCSBP β を有するサイトゾルフラクションを用いて試験すべきリガンドの結合能を測定することもできる。CSBP β を発現させる目的に組換え細胞を用いる場合、あるとしても結合が目的とする発現タンパク質の存在に起因するよう、内因的CSBP β 活性のほとんどないまたは全くない細胞を用いることが好みしい。また、CSBP β を、結合に寄与するかもしれない内因性細胞タンパク質から分離できるペプチドまたはタンパク質フラグメントとの融合体として設計する。前記したように、特異的に設計されたレセプター結合のインヒビターを構築することができる。例えば、融合タンパク質は本発明のCSBP β をCSBP β /リガンド結合に感受的なタンパク質ドメインを融合させることで製造できる。本明細書でインヒビタードメインと称されるそのようなドメインは、それ自身で、または補助分子と一緒にになって、レセプター・リガンド結合を指示する分析的に検出できるシグナルを有する能力を有する。この方法の要法は、CSBP β をTHP-1または他の哺乳細胞にて融合タンパク質（例えば、FLAGペプチドと融合した）として発現させ、THP-1細胞を適当に刺激し、前処理した後、その融合ペプチドを組換えCSBP β を刺激する手段として用いることである。かかる発現は、ウイルスプロモーター、例えば、CMV、RSVおよびオリゴデオキシリヌクレオチド、et al SV40、ウシ成長ホルモンおよびG418などの選択可能なマークーまたは安定したトランスクレタントを選択するためのヒドロマイシンを利用する多くの哺乳動物発現ベクターで達成することができる。

【0034】そのような融合体を発現するトランスクレタントまたは形質転換した細胞からのサイトゾル調製物を利用してもよい。リガンドを同定するのに有用な前記した技法はすべて、薬物スクリーニングおよび薬物開発プロトコルにおいても有用である。

【0035】また、SB202190または関連する化合物との競合結合アッセイにおいて、粗製THP-1細胞ライゼートの代わりに精製した組換えタンパク質を用いることもできる（Leeら、Nature 372 : 739-746）。このアッセイはCSBP β と結合する新規化合物についてスクリーニングするのに、あるいは結合することができる化合物の変化を評価する方法として有用である。精製したタンパク質の有効性は粗製材料について前記したアッセイから選択的にアッセイを設定できることである。例えば、タンパク質が、比色定量アッセイにおける設定のためのタンパク質結合部位などのタグ、例えば、複合抗体に、または酵素活性を直接検出するための酵素、例えば、ホースラティッシュ・ペルオキシダーゼもしくはアルカリ性ホスファターゼに共有結合するとす

れば、固体マトリックス上に見られる新規な化合物への結合が検出できる。かかる化合物は低分子量有機分子、ペプチド、ペプトイドおよびタンパク質を包含し得る。後者においては、該タンパク質を、そのシグナル化カスケードにおける他のタンパク質、例えば、活性化単素におけるサイトカイン翻訳の活性化についての経路にあるものを単離する方法として用いることができる。また、CSAID結合標識により作用する哺乳動物細胞内にある天然の調節分子を単離するのに該タンパク質を用いてもよい。最後に、該タンパク質を用いてファージ表面に見られる特徴的ペプチドを同定することができる。

【0036】CSBP β がタンパク質キナーゼをコードするという理解は、組換え形態を用いてタンパク質キナーゼ活性を確立することができることを示唆する。典型的には、これはCSBP β を $\gamma^{32}P$ -ATPの存在下でタンパク質またはペプチド基質と共に直接インキュベートし、つづいて分離し、計数することにより基質中に取り込まれた放射性活性を測定することからなる。分離法は、免疫沈降法、基質と遠心分離により分離させたビースとの結合操作またはシンチレーション近接アッセイによる取り込み量の測定、SDS-PAGEをつづいてオートラジオグラフィーまたはバイオセンサー分析を包含する。特異的な基質はいまなおわかつていないが、候補基質として、CSBP β それ自体（オートリン酸化）、ミエリン塩基性タンパク質、ATP2、MAPKAPキナーゼ-2、MAPKAPキナーゼ-3 (McLaughlinら、J. Biol. Chem. 271: 8488-8492 (1996) およびその中の引用文献）および公知MAPキナーゼ基質に適するペプチドが挙げられる。他の基質は、CSBP β を、固体支持体に結合するかまたはファージに見られる（上記参照）無作為なペプチドとインキュベートすることにより、またはCSBP β を哺乳動物細胞ライゼート（例えば、THP-1細胞ライゼート）および $\gamma^{32}P$ -ATPと一緒にインキュベートし、つづいて標識化特徴的タンパク質を分離し、配列決定することにより判明するかもしれない。キナーゼ活性はまた、アンチホスホチロシン抗体を用いることで検出される。CSBP β のタンパク質キナーゼ活性は特異的MAPキナーゼとのインキュベートを必要とするかもしれない。これはCSBP β を刺激した真核細胞（例えば、LPS処理THP-1細胞）からのライゼートおよびATPとブレインインキュベートに付することで達成できる。別法として、高濃度オスモル濃度条件にて増殖させたHOG1欠失株を救う能力を有するため、インビオにおけるCSBP β 活性を遮断する化合物を直接スクリーニングすることができる。例えば、化合物は高濃度オスモル濃度にてCSBP β +/-HOG1+/-株の増殖を遮断するその能力についてスクリーニングすることができるが、標準的な高濃度オスモル濃度での同じ株または高濃度オスモル濃度でのCSBP β -/-HOG1+/-株での増殖については効果がない。酵母をベースとするアッセイの感度は、細胞膜および透過性に影響を及ぼす宿主変異を導入することにより増大させることができる (Gaberら、Mol. Cell. Biol. 9: 3447-3456 (1989))。

【0037】これらのアッセイで、インビオにおけるCSBP β キナーゼ活性、CSAIDの公知特性を阻害する化合物を発見し、修飾することができる (Leeら、Nature, 前掲)。かかる化合物は前記した化合物と

の比較方法でサイトカイン合成を遮断するであろう。その化合物はまた、それ自身がサイトカイン生成を遮断する新規な化合物を発見するための実現可能な標的である新規な基質の発見をもたらしうる。

【0038】他のMAPキナーゼと同様、CSBP β はMAPキナーゼキナーゼにより活性化され、したがって組換えタンパク質はCSBP β のMAPキナーゼキナーゼと推定されるものでリン酸化される能力を測定する第2アッセイを確立させると考えられる。この場合、刺殺細胞ライゼートからのフラクション（例えば、LPSで刺激したTHP-1細胞）を、 $\gamma^{32}P$ -ATPの存在下でCSBP β とインキュベートし、 $\gamma^{32}P$ -標識のCSBP β への取り込み量を分離および計数により測定する。分離は多くの方法で行うことができる：一の方法は、ペプチドまたはタンパク質に結合したCSBP β を用い、そのペプチドまたはタンパク質依存性抗体とのアフィニティクロマトグラフィーまたは免疫沈降を介して分離することにある。別法として、CSBP β をビーズに直接接合させるか、または融合ペプチドまたはタンパク質（例えば、FLAG（ペプチド）、グルタチオニン-8-トランスフェラーゼ）を介して結合させ、細胞ライゼートとインキュベートした後で遠心分離により分離することができる。さらに、CSBP β のチロシンリン酸化は市販されている抗ホスホチロシン抗体を用いる免疫沈降またはイムノプロットで検出できる。

【0039】これらのアッセイを用いてCSBP β キナーゼ活性の活性化を遮断する化合物を見い出すこと、既に発見されている化合物の効能を改良することができる。これら化合物はサイトカイン合成を遮断することに有用性があると考えられる。ヒトCSBP β は高濃度オスモル濃度条件下で増殖させたHOG1欠失株を救う能力を有するため、インビオにおけるCSBP β 活性を遮断する化合物を直接スクリーニングすることができる。例えば、化合物は高濃度オスモル濃度にてCSBP β +/-HOG1+/-株の増殖を遮断するその能力についてスクリーニングすることができるが、標準的な高濃度オスモル濃度での同じ株または高濃度オスモル濃度でのCSBP β -/-HOG1+/-株での増殖については効果がない。酵母をベースとするアッセイの感度は、細胞膜および透過性に影響を及ぼす宿主変異を導入することにより増大させることができる (Gaberら、Mol. Cell. Biol. 9: 3447-3456 (1989))。

【0040】本発明の化合物をスクリーニングする場合において、単離した形態、固定した形態または細胞結合した形態のCSBP β を複数の候補分子と接触させ、そのタンパク質と結合し、かつ相互反応する候補分子を選択する。結合または相互反応は、目的とする放射性活性標識した候補分子を用いることで直接的に、または候補化合物の相互反応または結合の結果得られる効果を測定することにより間接的に測定できる。また、候補化合物

を結合スクリーニングアッセイ。すなわち、好ましくは分析して検出可能な試薬、最適には放射性活性で標識した公知のリガンドを試験すべき化合物と一緒に導入し、その標識したりガンドの結合を阻害または亢進する化合物の能力を測定するアッセイに付すことができる。CSBPβとのアフィニティおよび選択性の増加について化合物をスクリーニングする。

【0041】本発明のこの態様を明らかにするために、天然物のスクリーンを行ってもよい。ミニカラムを用いる酢酸クロマトグラフィーにより結合リガンドを遊離リガンドから分離する標準アッセイを用いて、スクリーニング操作を開始する。海洋抽出物、微生物抽出物および植物抽出物をTFFP、1サイトゾルとのH-CSAID結合の阻害について試験する。結合が約80-200 μg/mℓのIC₅₀で特徴付けられれば、抽出物はアンタゴニストと確認される。選択された一群のいづれかの「抑制(nuisance)抽出物」による阻害を検査することができないことと関連してヒット率が低いことは、該アッセイがスクリーニング操作を支持するのに十分に選択性かつ効果的であることを示唆する。高処理スクリーニング能を容易にする結合アッセイのさらなる改良はスピンカラムを用いて遊離リガンドから結合リガンドを分離するマイナーな修飾により達成することができる。

【0042】阻害剤

本発明のCSBPβがセリントレオニンタンパク質キナーゼのCSBP-MAPキナーゼに相同期であるという知見により、広範囲に及ぶ急性および慢性炎症疾患を治療するための理論的根拠が得られる。従って、サイトカイン介在疾患を患っている患者をCSBPβ阻害量のCSAIDで治療することも本発明のさらなる態様である。かかる疾患の代表例として、アルツハイマー型の老人性痴呆症(ADAT)、多発性硬化症、脳性マラリア、発作、脳外傷および脊髄障害などの中枢神経系に付随する疾患；再発率およびアドローム性動脈硬化症などの心臓血管疾患；成人呼吸困难症候群(ARDS)、慢性リウマチ関節症、変形性関節症、炎症性腸疾患疾患(IBD)、乾癬、皮膚炎、喘息などの炎症疾患；および骨粗鬆症、外科的または外傷的インシデントによる敗血症、慢性腎不全、 AIDS、カバキシ-および自己免疫疾患、例えば、エリトマトーデス、宿主移植片拒絶反応および移植片対宿主疾患などの異常機能または過剰サイトカインに伴う疾患または症状が挙げられるが、これに限定されるものではない。かくして、本発明は、CSBPβ阻害量の化合物を投与することによりかかる疾患を治療および/または改善することを意図とする。本発明のCSBPβの機能に関する理論に拘束されることなく、CSBPβ機能を阻害する有用なものには、CSBPβのキナーゼ活性を阻害する化合物があると考えられる。他の阻害剤が、もちろん、シグナルransductionショーンカスクードにあるとの立場を取ることも可能であ

る。したがって、CSBPβとその上流または下流にある1またはそれ以上の基質との相互作用を阻害することも本発明の意図するところである。

【0043】組成物/投与

本発明はまた、前記した方法により同定した化合物と、医薬上許容される粗体とからなる医薬組成物を意図する。本発明のタンパク質様物の医薬組成物は、特に、非経口投与、すなわち、皮下投与、筋肉内投与または静脈内投与に有用である。非経口投与用組成物は、一般に、許容される粗体、好ましくは水性粗体に溶かした本発明の化合物の溶液またはそのカクテルからなる。種々の水性粗体、例えば、水、緩衝水、0.4%食塩水、0.5%グリシンなどを用いることができる。これらの溶液は滅菌されており、致死物のないのが一般的である。これらの溶液は慣用的な周知の滅菌法により滅菌処理することができる。組成物は、要すれば、適當な生理学的条件で、pH調節および緩衝剤などの医薬上許容される補助物質を含んでいてもよい。そのような医薬組成物における本発明の化合物の濃度は極めて広く、すなわち、約0.5重量%以下から、通常、または少なくとも1重量%、1.5または2.0重量%と同じ量まで変化させることができ、選択される個々の投与経路に従って、主に液体容量、粘度などに基づいて選択される。

【0044】かくして、筋肉内注射の場合の医薬組成物は1mLの滅菌緩衝水および5.0mgの化合物を含有するよう調製できる。同様に、静脉内注入の場合の医薬組成物は2.50mLの滅菌リンガー(Ringer)溶液および1.50mgの化合物を含有するよう調製できる。非経口投与可能な組成物の製法は周知であるか、または当識者にとっては自明であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science、第15版、Nest Publishing Company、Easton、Pennsylvaniaにてさらに詳細に記載されている。本明細書に記載の化合物は貯蔵のために凍結乾燥させ、使用前に適當な粗体で復元することができる。通常のタンパク質でこの方法が効果的であることがわかっていること、当該分野にて公知の凍結乾燥法および復元法を用いることができる。

【0045】同定される薬物が非タンパク質様である場合には、それは単独でまたは医薬上許容される粗体と組み合わせて投与できる。その割合は、化合物の溶解度および化学特性、選択される投与経路および標準的製剤慣習により決定される。例えば、繊粉、乳糖、特定の種類のタレイなどの賦形剤を含有する錠剤またはカプセルの形態にて経口投与してもよい。活性成分をショ糖およびコーンのシロップ、フレーバー剤および染料と混合し、ついで十分に脱水し、固体形に打撃するのに適するようにしたトローチまたはロゼンジの形態にて舌下投与してもよい。非経口的に、すなわち、筋肉内、静脉内または皮下的に注射してもよい溶液の形態にて経口投与してもよい。非経口投与する場合、他の成分、例えば滅菌蒸留

を等量にするのに十分な食塩水またはグルコースを含有する浴液の形態にて用いることができる。

【0046】顧問医は最適と思われる治療薬の量を決定する。その量は投与形および選択される個々の化合物で変化し、さらには治療される個々の患者で変化するであろう。顧問医は、一般に、最適量よりも実質的に少ない量の化合物で治療を開始し、その状況下で最適な効果を得られるまで用量を少しづつ増加させるであろう。一般に、組成物を経口投与すると、非経口投与と同じ効果を得るのにより多量の活性剤が必要とされるであろう。該化合物は他のセロトニンnergic (serotonergic) 薬と同じ方法にて有用であり、その投与量レベルはこれらの他の治療薬で通常用いられるのと同じ大きさである。治療用量は、一般に、一日当たり1ないし1.0mgまたはそれ以上であるが、数個の異なる投与単位を投与してもよい。0.5ないし1.0mgの活性剤を含有する組剤が特に有用である。

【0047】患者の症状に応じて、予防的および/または治療的処理のために本発明の医薬組成物を投与することができる。治療に用いるには、組成物を既に疾患に罹患している患者にその疾患およびその合併症を治療するかまたは少なくともいくらか改善するのに十分な量にて投与する。予防に用いるには、本発明の化合物を含有する組成物またはそのカクテルをまだ発病していない患者に投与し、その患者の耐性を強化させる。医薬組成物の一回投与または複数回投与は、顧問医により選択される投与レベルおよびパターンで実施することができる。いずれにしても、本発明の医薬組成物は、患者を効果的に治療するのに十分な一定量の本発明の化合物を供給しなければならない。

【0048】プローブ

本発明の核酸は、ヒトCSBP β 配列との特異的ハイブリッド形成能を有するプローブを提供するのに特に有用である。プローブ法は当該分野にて周知であり、プローブの大きさは大きく変化するが、それは大きさが少なくとも15級のスクレオチドであることが好ましいことは明らかである。また、プローブの固定を容易にするために、かかるプローブは分析的に検出可能な試薬で標識化でき、かつそれが好ましいことは明らかである。有用な試薬は、限定するものでないが、放射性活性体、蛍光染料、検出可能な生成物の形成の酵素能を有する酵素を包含する。本発明は、例えば、異常な、すなわち増加または減少レベルのレセプター遺伝子発現により特徴付けられる病態を診断するにおいてレセプターをコードするプローブを用いることに関する。また、該プローブを用い、そのレセプターをコードする遺伝子にて染色体または分子変異を有する細胞を同定することができる。当業者が使用する条件に応じて、そのプローブを用い、他の細胞型および細胞よりこの附加的な例示としてのレセプター（そのゲノム形またはcDNA形）を同定かつ回収

することができる。従して、ハイブリッド形成条件を厳格にすればするほど、より密接に隣接する遺伝子が回収されるであろう。

【0049】アンチセンス

CSBP β について本明細書に開示されている配列に基づくアンチセンスオリゴスクレオチドも本発明の範囲内にある。レセプター遺伝子をコードする標的核酸を認識して特異的に結合し、遺伝子発現、例えば、標的核酸がmRNAである場合、遺伝子の翻訳を阻害するように、合成オリゴスクレオチドまたは関連するアンチセンス化學構造アナログを設計する。アンチセンス薬物の作用機構について特定の理論で拘束するつもりはないが、かかる薬物はまたはそれ以上の以下の機構：mRNAに結合し、RNase Iなどの内因性スクレアーゼによる分解を誘導することによるか、または産生的タンパク質合成に不可欠な調節因子もしくはリボソーム成分への結合を阻害することによりmRNAの翻訳を阻害することにより作用していると考えられる。加えて、アンチセンス配列は、そのアンチセンス配列がリボザイム配列または

20 反応基と一緒にになり、目的とするmRNAを特異的に標的とするように用いられ、そのmRNAを分解するかまたは化学的に修飾する、複数の大分子アレイの成分として用いることができる。アンチセンス技術の一般的分野は、以下の文獻にて示されている。その内容を出典明示により本明細書の一部とする（Cohen, J. S., Trends in Pharm. Sci., 10: 436 (1989) およびWeintraub, B. M., Scientific American Jan. (1990), 46頁）。

【0050】遺伝子治療

本発明はまた、遺伝子治療における本明細書に開示のDNA配列の使用に関する。CSBP β はタンパク質キナーゼであるため、キナーゼとして不活性であるが、同じ細胞にて共同発現される内因性CSBP β の活性化を遮断する部位特異的変異体を製造することが可能である。すなわち、それは優性陰性変異体である（Kolchら, Nature 349: 426-429 (1991)）。この変異体タンパク質をコードするDNAを遺伝子治療にて用い、慢性炎症を減少させることができた。DNAをインビートにて經的細胞、例えばアデノウイルス、レトロウイルスに向かづけるのに利用することのできる多くのベクターおよびデリバリー系がある。

【0051】抗体

本発明はまた、CSBP β から本明細書に開示されているアミノ酸配列に対応するエピトープに方向付けられるモノクローナルまたはポリクローナル抗体を包含する。免疫学的に、レセプターの特に重要な領域は、タンパク質のリガンド結合ドメインに結合する領域である。該領域に方向付けられる抗体は、タンパク質-リガンド相互反応に対するその効果のため、診断および治療に用いるのに特に有用である。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を產生する方法は周知である。例えば、Ausube

らのChap. 11(前掲)を参照のこと。本発明はまた、CSBP β 活性化に伴う病態を治療または改善するために、天然のリガンドが該タンパク質に結合することを遮断する、CSBP β に競争するように方向付けられた有効量の抗体またはそのフラグメントからなる組成物を提供する。

【0052】本発明の結合タンパク質または少なくとも1つのエピトープを有してなるそのフラグメントを用いて、ポリクローナルおよびモノクローナルの両方の抗体を産生することができる。ポリクローナル抗体が望ましい場合、選択した哺乳動物(例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど)を本発明の結合タンパク質またはそのフラグメントあるいは変異した結合タンパク質で免疫処理する。免疫化動物からの血清を公知方法に従って収集して処理する。ポリクローナル抗体を含有する血清を用いると、ポリクローナル抗体をイムノアフィニティーカロマットグラフィーまたは他の公知操作により精製することができる。

【0053】本発明のタンパク質およびそのフラグメントに対するモノクローナル抗体もまた、当業者であれば容易に産生することができる。ハイブリドーマ技法を用いることでモノクローナル抗体を産生する方法論がよく知られている。不死抗体産生細胞系は、細胞融合により、およびまたヨリシバ球を腫瘍DNAへ直接形質転換するか、またはEpstein-Barrウイルスでトランスフェクションするような他の方法により形成させることができる。例えば、K. Schreierら、「Hybridoma Technique」(1980); Hammerlingら、「Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas」(1981); Kennethら、「Monoclonal Antibodies」(1989)を参照のこと; また、米国特許第4341761号; 第4399121号; 第4427783号; 第444837号; 第4452570号; 第4466917号; 第4472500号; 第4491632号; および第4493890号を参照のこと。目的とするタンパク質またはそのフラグメントに接続して産生されるモノクローナル抗体のパネルは、種々の特性について、すなわち、イソタイプ、エピトープ、アフィニティーなどについてスクリーニングすることができる。別法として、目的とするモノクローナル抗体をコードする遺伝子は当該分野にて知られているPCR技法によりハイブリドーマから単離し、適当なベクターにてクローンし、発現させることができる。モノクローナル抗体は、イムノアフィニティーテク法を用い、その抗体が対応するよう方向付けられる個々のタンパク質の精製において有用である。本発明の抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれでも、イムノアッセイ、RIA、ELISAなどで試験として用いることができるという点で付加的な有用性を有する。加えて、該抗体を用いてヒト細胞からCSBP β を単離し、内因性CSBP β のリン酸化状態およびタンパク質キナーゼ活性に対する異なる刺激および化合物の効果を測定することができる。

該抗体を用いて、CSBP β のリン酸化またはキナーゼ活性を遮断する新規な化合物を見出または修飾するための組織培養を基礎とするアッセイを確立することができる。かかるアッセイの一例は、CSBP β を発現するヒト細胞系を化合物または化合物の混合物と一緒にインキュベートし、所定の期間適当なLPS刺激(例えば、LPS、浸透性ストレス)で処理し、ついでCSBP β を抗体と免疫沈降に付し、イムノプロットまたはクロマトグラフィーまたは通常のタンパク質もしくはペプチド基質でのそのキナーゼ活性の測定を介してそのリン酸化状態を評価することである。

【0054】トランスジェニック

適当な受精卵または胚生の胎児を本明細書に開示のCSBP β をコードする核酸でトランスフェクションすることにより、ヒト以外のトランスジェニック動物を得てもよい。例えば、米国特許第436866号; 第5175386号; 第5175384号および第5175386号を参照のこと。得られたトランスジェニック動物をCSBP β /リガンド相互作用を研究するためのモデルとして用いることができる。特に有用な動物は、タンパク質の発現に伴い検出可能な表現型を示す動物である。ついでその開拓する表現型を遮断または悪化させる薬物の能力について、薬物をスクリーニングすることができる。本発明はまた、CSBP β をコードする遺伝子を、種々の濃度または代謝条件に特異的に応答する翻訳因子に機能的に連結させ、それによりその条件に応答して表現形発現を効率的にターンオンまたはオフさせることを意図とする。

【0055】本明細書に開示の核酸プローブを用い、所望の実験動物種からヒトCSBP β 遺伝子の同様体ページョン、例えばネズミページョンをクローンすることができる。その遺伝子が保存的遺伝子ノックアウト技法により挿入されているマウス線を発育させることができる。ついで、該遺伝子を本発明のCSBP β -DNAと置換/交換し、インビボにて候補薬物をスクリーニングするためのマウスを獲得する。同様の遺伝子ノックアウトおよびヒトタンパク質阻害の研究を酵母で行うこともできる。

【0056】

【実施例】本発明を実施例を用いてさらに詳しく説明する。実施例は、特定の具体例を参照することにより本発明を説明するためにのみ提供される。これらの例示説明は本発明の特定の態様を説明するものであるが、開示した発明の範囲を限定または制限するものではない。本明細書中の特定の用語は、上記の定義において説明されている。すべての実施例は標準的方法を用いて行われ、特記しないかぎり、それらの方法は当業者によく知られており、通常的なものである。以下の実施例の通常的方法は、例えばSambrookらの標準的な実験室マニュアルに記載されているようにして行うことができる。

【0057】実施例1—組織分布

ノーダンプロットをClontechからのヒトマルチ組織ノーダン上で前記した部分C S B P cDNAを用いて行った (Lee, J.C., Leydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kemer, S., Green, D., McNulty, B., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvastier, S.W., Strickler, J.L., McLaughlin, M.M., Sissons, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.L. より Young, P.R. (1994) *Nature* 372, 739-746)。C S B P β はヒト組織で最も多く発現し、肺臓、前立腺および小腸ではより少なく量で発現した。弱い発現が脾臓、胸腺、PBL より骨格筋で見られた。

【0058】実施例2～MAPキナーゼ種に対する本モジーおよび表現

C S B P β はセリン-トレオニン・タンパク質キナーゼのMAPキナーゼ種のメンバーである (Marshall, C.J. (1994) *Curr. Opin. Genet. Develop.* 4, 82-89)。MAPキナーゼ種のメンバーは、活性部位付近の活性化ループにて「T x Y」アミノ酸モチーフ (T=トレオニン、Y=チロシンおよびx=いずれかのアミノ酸) を有することで特徴付けられる。適切な刺激に応答してMAPキナーゼキナーゼによりチロシンおよびトレオニンの両方がリン酸化されるには、MAPキナーゼ活性の活性化が必要とされる。「x」アミノ酸の特性および活性化ループの大きさにより区別される3種のMAPキナーゼがある (Cano, E. より Mahadevan, L.C. (1996) *Trends Biochem. Sci.* 20, 117-122)。かくして、e-r kはTEYを有し、J N K / S A P K はT P Yを有し、C S B P / p 38はT G Yを有する。これらの違いは、活性化MAPキナーゼキナーゼ、および各MAPキナーゼを活性化する細胞刺激における違いに反映している。各種内で、活性化刺激は非常に似ているようである。したがって、e-r kは主にミトケン性刺激 (例えば、EGF、PDGF) に応答するのに対して、J N K / S A P K や C S B P / p 38は数種の細胞性ストレス (例えば、UV、殺透性、熱または化学ストレス、低酸素症、酸化剤など) やおよびプロテラクチン性刺激 (例えば、LPS、IL-1、TNFなど) に応答する。

【0059】最近になって、新規な形態のC S B Pが数種同定された。C S B Pの2種のスプライス変種、C S B P 1 より C S B P 2 に加えて、核タンパク質M a x を用いる酵母2-ハイブリッド相互反応スクリーンを介して、さらなるスプライス化変種が同定された (Zervos, A.S., Puccio, L., Gatto, J.P., Kyriakis, J.M. より Ubrent, R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10531-10524)。最近になってまた、C S B P種の特徴である「T G Y」モチーフも保持している、有意なアミノ酸同一性を有する2つの相間体が同定された：p 38 β (Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, H., Segner, J.A., Lin, S. より Nan, J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 17920-17926) より ERK 6 / S A P K 3 (Luchner,

C., Zahalka, M.A., Giot, J.-F., Moller, N.P.H. より Ulrich, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 43-48; Mertens, R., Craxton, M. より Geerdert, M. (1996) *FEBS Lett.* (In Press))。

【0060】C S B P 1 より C S B P 2について前記したのと同じ方法にて、C S B P β を酵母発現について遺伝子操作してもよい (Kumar, S., McLaughlin, M.M., McDonnell, P.C., Lee, J.C., Livi, G.P. より Young, P.R. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 29043-29046)。X h o I 部位をポリメラーゼ連鎖反応によりC S B P β の初期コードで遺伝子操作する (Mallin より Fallon, M. *h. Enzymol.* 159: 335-50 (1987))。ついで、C S B P β 含有のX h o I / B g I 1 1 フラグメントをp 1 B S N B Uの同じ部位にライゲートし、T r p 選択可能なマークターをURA 3で置換する、p 1 B S N B (McHale ら, Mol. Pharm., 39: 109-113 (1991)) の修飾を行った。また、X h o I 部位、FLAGエピトープおよびC S B P β のアミノ末端スクレオチド配列を含むポリメラーゼ連鎖反応を用いることで、C S B P β のアミノ末端をFLAGエピトープなどのエピトープ・タグに融合させることができる (例えば、試薬はIBI-Kodakより入手)。

【0061】C S B P β のアミノ末端をFLAGエピトープと融合させることにより、C S B P β をまた、HeLa より JURKATなどの哺乳動物細胞における発現用に遺伝子操作させることができる。ヒトC S B P β の完全な読み替わる構造を含有するXba I / Xba I 制限フランメントを、そのフランメントが当初はクローンされているBluescriptプラスミドより除外し、Xba I より Smal I で切断したベクターpSPORT (GIBCO-BRL) に挿入した。ついで、得られたベクターpSPORT-C S B P β をSma I より Bam HI で切断し、次の2つのオリゴヌクレオチド: 5' GATCCGGTACCATGGATTATAAAGATGATG ATGATAAAAGCCTCATCCGGAAAAA GGGCTTCTACAAACCAGGAGCT-3' (配列番号2) より 5' -CCTGCTTGTAGA AGCCCTTTTCCGGATGAGGCTTT ATCATCATCATCTTATAATCCATG GTACCG-3' (配列番号4) を一緒にハイブリッド形成することで調製した合成オリゴヌクレオチドリンクターにライゲートし、pSPORT-FLAG-C S B P β を形成させた。ついで、FLAG-C S B P β 総合體全体を Hind III / Sma I 制限フランメントのpSPORT-FLAG-C S B P β より除去し、Hind III より Eco RV で切断したpCDNにライゲートし、pCDN-FLAG-C S B P β を形成させた。ついで、これは、多くの確立されたプロトコル、例えば、リガフェクタミン (GIBCO-BRL) を用い、HeLa または JURKATなどの哺乳動物細胞に

トランスフェクションすることができる。細胞を適当な調理（例えば、浸透性ショック、UV、1L-1）で処理し、FLAG-CSP β の活性化を誘導し、CSAIDのCSP β のキナーゼ活性を阻害する能力を介してCSAID結合を検出することができる。かくして、FLAG-CSP β をトランスフェクションされた哺乳動物細胞からFLAGエピトープ（IBI-Kodak）に対する抗体との免疫沈降に付すことができ、前記したようにインビトロ・キナーゼ・アッセイをCSAIDの存在または不在下で適当な基質（例えば、ミエリン塩基性タンパク質、MAPKAPキナーゼ-2または-3）を用いて行うことができる（Leeら、（1994）Nature 372: 739-746；McLaughlinら、J. Biol. Chem. 271: 9488-9492 (1996)）。

【0062】実験例3-E. coliにおける表現

本発明の單離cDNAによりコードされるタンパク質がCSAIDに結合しうることを確認するために、cDNAをE. coli、酵母および哺乳動物細胞（例えば、HeLa、CHO、BT2）にて発現させることができる。E. coliにおいて、CSP β は、例えば β -ガラクトシダーゼ、エンテロキナーゼ切断可能なFLAGエピトープタグ、グルタチオニートランスフェラーゼまたはヘキサヒスチジン尾端との融合タンパク質として同定される。（FLAGはその試薬がIBI-Kodakより入手可能な市販のエピトープである。）後者の場合、これは開始部位、抗原認識配列およびエンテロキナーゼ切断部位を有する合成オリゴスクレオチドリソマーを設計することにより達成される。タンパク質をpLacZ（例えば、Bluescript KSベクター（Stratagene, LaJolla, CA）またはλpL（Shatzmanら、N.Y. Acad. Sci.、478: 233-248 (1986)）プロモーターのいずれかの制御の下で発現させ、細胞ライゼットにて分離される大きさのタンパク質と特異的に連絡することが知られているラジオフォトアフィニティ-CSAIDをプローブに付す。E. coliにて発現したタンパク質は、製造者の指示に従って、FLAGエピトープに対するモノクローナル抗体を含有するアフィニティマトリックス、グルタチオン・ビーズまたはNiNTAカラムに通することで精製される。

【0063】

【配列表】（1）一般的情報：

（i）出願人：マックドナルド・ピーター

ヤング、ピーター

（ii）発明の名称：基剤結合蛋白

* （i）配列の数：4
（ii）連絡先：
（A）宛名：スマスクライン・ピーチャム・コーポレーション

（B）通り名：スウェード・ランド709番

（C）都府名：キンタ・オブ・ブルシア

（D）姓名：ベンシルベニア州

（E）国名：アメリカ合衆国

（F）郵便番号：13406-0939

（v）コンピューター・リダブル・フォーム：

（A）媒体形態：ディスクケット

（B）コンピューター：IBM コンパチブル

（C）オペレーティングシステム：DOS

（D）ソフトウェア：Basic EQ Version 1.6

（vi）提出願データ：

（A）出願番号：

（B）出願日：

（C）分類：

（vii）先の出願データ

（A）出願番号：08/468902

（B）出願日：1995年6月6日

（A）出願番号：08/123175

（B）出願日：1993年9月17日

（A）出願番号：08/250975

（B）出願日：1994年5月31日

（viii）代理人等の情報：

（A）氏名：シェレッタ、パトリシア・エイ

（B）登録番号：33,777

（C）代理人等における処理番号：ATG 50036

（ix）テレコミュニケーションの情報：

（A）電話番号：610-270-5031

（B）テレファックス番号：610-270-5090

【0064】（2）配列番号1の情報：

（i）配列の特徴：

（A）配列の長さ：1838塩基対

（B）配列の型：核酸

（C）鎖の数：一本

（D）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の種：cDNA

（iii）ヒボセティカル：なし

（iv）アンチセンス：なし

（v）起源：

（x）配列の記載：配列番号1：

GCAGGAAGCG AGCCGCCACG CGGGGGCGGC CGAGATCGG TGCCCCGGAT GAGCTTCATC	60
CGGAAAMGG CCTTCTACAA GCAGGAGCTC AACAAAGACCG CCTGGGGACT GCGCAAGACC	120
TACGTCTCC CGACCCAGGT CGGCAGCGGG GCCTATGGCT CCTGGTGCTC GGCCATCGAC	180
AAGGGCTCAG GGGAGAAGGT GGCCATCAAG AACCTGAGCC GACCTTTCA GTCCGAGATT	240
TTCGCTTAAGC GGAGCTACUG CGAGCTCTG CTGCTGAGCG ACATGAGCA TGAGAACGTC	300
ATTGGCTTCC TGTATGTTT CACCCCAACC TCCCTCCTCC GCAACTCTCA TGACTCTAC	360

29.

30

CTGGTGATGC CCTTCATGCA GACGGATCTG CAGAAGATCA TGGGGATGGA GTTCAGTGAG 420
 GAGAAGATCC AGTACCTGCT GATCATGATG CTAAAGGCC TTAACTACAT CCACTCTGCT 480
 CGGTCTGTC ACAGGGAGCT GAACTCAGGC AACCTTGCTG TGAAATGAGGA CTGTGAGCTG 540
 AAGATTCTGG ATTTCGGCTG GGCGCGACAT CGAGACCCG AGATGACTGG CTACGTGCTG 600
 ACCGGCTGTG ACCGAGCCCG CGAGCTGATC CTCAGCTGGA TGCACTACAA CGACACAG 660
 GACATCTGG CTGGTGCTG TATCATGGCA GAGATGCTGA CAGGGAAAAC TCTGGTCAAG 720
 GGRAGAGATT AGCTGGACCA CCTGACCCAG ATGCTGAANG TGACCGGAGT CCTTGACAG 780
 GAGTTTGTC AGAGAGTGAA CGAAUAAAGG CCCAAATGCT ACATCCAGTC CCTGCCACAG 840
 ACCCCCCAGGA AGGATTCAC TCAUCGTGTC CCACGGGCGA CGGGCGAGGC TGCGGACCTG 900
 CTGGAGAAGA TGCTGGAGCT AGAGCTGGAC AACGGCTGGA CGGGCGGCGA GGGCGCTAAC 960
 CATCCCTCTT TTGAAACCCTT CGGCGACCTG GAGGAAGAGA CGAGACCGCA CGAGCCCTTT 1020
 GATGATTCT TAGAACACAGA GAACTCACA CTGGATGAAT CGAACAGCGA CATCTACAG 1080
 GACAITGIGA ACTTCAGGCC CATTGGCGG AAGGACTCAC CGCGCGGAG TGCCATGAAG 1140
 CTGTAAGGAC CGATCTTCA TGCGACCGCC CGGGAGACAC TGCCCAAGGA CGAGTATTG 1200
 TCACIACAA ACTTCAGGCC TCTTGGAAATA CAGCGTTCA AGCGAGGAG AGAAGGTTCC 1260
 TTCTCCCTAT CGGGAAATG CGCTCTGAG ATGCGAGAATT CAAGAGTC CGTTGGAGA 1320
 AATAGCTCT GATGCTAACCA CGGCACTGTA AACGCGCCAT CTGGAGAATC CGCTGCAGGT 1380
 CGGGCGCTT CCTCCCGCGC AGAGCTGGGC TGACTGGGC CGGCGCCAGG CGGGCGCCCT 1440
 ATUGGAGTCA TGTGTGTTG GTTTCCTAGG GATGCTCTAA CGAATTACCA CGAACCTGGT 1500
 GGATGAAAC AGGAGAACTT GATGCTCTTA CAGTTCTGGA CGCTGGAAAT YTGGGAGTGA 1560
 GGTGTTGGCA CGGCTGTGCT CCTTGGAAAG CGCTCTGGGA AGAATCTTC CTGGCTCTT 1620
 TTGAGCTCTG CGGGCGAGTG CGGAGCTGCTT CGCATTCCTT TTAACAAACAG TCATGGATT TAGGGCGAC 1680
 CCTAATCTG TGTGATYTTA TYTTGAGCTT TATTAATTAA ACCCGAAAT ACTCTAGTTC 1740
 CAATAAAAGT CACATTCACA CCTTCAGGT CGACATGA 1838

【0066】(2) 配列番号2の情報:

* (i) 分子の型: ベプチド

(i) 配列の特徴:

(ii) ヒポセティカル: なし

(A) 配列の長さ: 365アミノ酸

(iii) アンチセンス: なし

(B) 配列の型: アミノ酸

(iv) フラグメントの型: N-末端

(C) 繰の数: 一本

36 (v) 起源:

(D) トポロジー: 直鎖状

*

(x) 配列の記載: 配列番号2:

Met Ser Leu Ile Arg Lys Lys Gly Phe Tyr Lys Glu Glu Leu Asn Lys

1 5 10 15

Thr Ala Icp Glu Leu Pro Lys Thr Tyr Val Ser Pro Thr His Val Gly

20 25 30

Ser Gly Ala Tyr Gly Ser Trp Cys Ser Ala Ile Asp Lys Arg Ser Gly

35 40 45

Glu Lys Val Ala Ile Lys Lys Leu Ser Arg Pro Phe Gln Ser Glu Ile

50 55 60

Phe Ala Lys Arg Ala Tyr Arg Glu Leu Leu Leu Lys His Met Gln

65 70 75 80

His Gln Asn Val Ile Gly Leu Leu Asp Val Phe Thr Pro Ala Ser Ser

85 90 95

Leu Arg Asn Phe Tyr Asp Phe Tyr Leu Val Met Pro Phe Met Gln Thr

100 105 110

Asp Leu Gln Lys Ile Met Gly Met Gln Phe Ser Gln Glu Lys Ile Gln

115 120 125

Tyr Leu Val Tyr Gly Met Leu Lys Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala

130 135 140

(17)

特許平11-196873

31

32

Gly Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro Gly Asn Leu Ala Val Asn Glu
 145 150 155 160
 Asp Cys Glu Leu Lys Ile Leu Asp Phe Gly Leu Ala Arg His Ala Asp
 165 170 175
 Ala Glu Met Thr Gly Tyr Val Val Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu
 180 185 190
 Val Ile Leu Ser Trp Met His Tyr Asn Glu Thr Val Asp Ile Trp Ser
 195 200 205
 Val Gly Cys Ile Met Ala Glu Met Leu Thr Gly Lys Thr Leu Phe Lys
 210 215 220
 Gly Lys Asp Tyr Leu Asp Glu Leu Thr Glu Ile Leu Lys Val Thr Gly
 225 230 235 240
 Val Pro Gly Thr Glu Phe Val Glu Lys Leu Asn Asp Lys Ala Ala Lys
 245 250 255
 Ser Tyr Ile Glu Ser Leu Pro Glu Thr Pro Arg Lys Asp Phe Thr Glu
 260 265 270
 Leu Phe Pro Arg Ala Ser Pro Glu Ala Ala Asp Leu Leu Glu Lys Met
 275 280 285
 Leu Glu Leu Asp Val Asp Lys Arg Leu Thr Ala Ala Glu Ala Leu Thr
 290 295 300
 His Pro Phe Phe Glu Pro Phe Arg Asp Pro Glu Glu Glu Thr Glu Ala
 305 310 315 320
 Glu Glu Pro Phe Asp Asp Ser Leu Glu His Glu Lys Leu Thr Val Asp
 325 330 335
 Glu Trp Lys Glu His Ile Tyr Lys Glu Ile Val Asn Phe Ser Pro Ile
 340 345 350
 Ala Arg Lys Asp Ser Arg Arg Arg Ser Gly Met Lys Leu
 355 360 365

【0066】(2) 配列番号3の情報:

* (i i) 分子の型: cDNA

(i) 配列の特徴:

36 (i i i) ヒポセティカル: なし

(A) 配列の長さ: 76塩基対

(i v) アンチセンス: なし

(B) 配列の型: 核酸

(v) フラグメントの型:

(C) 線の数: 一本

(v i) 起源:

(D) トポロジー: 直線状

*

(x i) 配列の記載: 配列番号3:

GATCGCTAC CATGGATTAT AAGCATGATG ATGATAAAAG CCTCATCCGG AAAAAGGCT	60
TCTACANCA GAAGCT	76

【0067】(2) 配列番号4の情報:

* (i i) 分子の型: cDNA

(i) 配列の特徴:

(i i i) ヒポセティカル: なし

(A) 配列の長さ: 68塩基対

40 (i v) アンチセンス: なし

(B) 配列の型: 核酸

(v) フラグメントの型:

(C) 線の数: 一本

(v i) 起源:

(D) トポロジー: 直線状

*

(x i) 配列の記載: 配列番号4:

CCTGCTTGA GAAGCCCTTT TTCCGGATGA GGCCTTTAIC ATCATGATCT TTATAATCCA	60
TCGTACCG	68

【図面の簡単な説明】

す。

【図1】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図3】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図2】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図4】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図5】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図6】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図7】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図8】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図9】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図10】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図11】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図12】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図13】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図14】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図15】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図16】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図17】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図18】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図19】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図20】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図21】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図22】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図23】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図24】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図25】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図26】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図27】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図28】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図29】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図30】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図31】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図32】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図33】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図34】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図35】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図36】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図37】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図38】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図39】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図40】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図41】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図42】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図43】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図44】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図45】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図46】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図47】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図48】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図49】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図50】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図51】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図52】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図53】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図54】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図55】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図56】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図57】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図58】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図59】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図60】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図61】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図62】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図63】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図64】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図65】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図66】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図67】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図68】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図69】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図70】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図71】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図72】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図73】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図74】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図75】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図76】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図77】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図78】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図79】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図80】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図81】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図82】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図83】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図84】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図85】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図86】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図87】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図88】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図89】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図90】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図91】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図92】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図93】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図94】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図95】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図96】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図97】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図98】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図99】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図100】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図101】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図102】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図103】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図104】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図105】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図106】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

す。

【図107】 C S B P β の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図1】

GCACAGGAGCAGCCCTGCAGCCCGGGGCGAGATCGGTGCCCGCATGAGCTCTTC 69
 M S D T

CGGAAAGAAGGCTTCTACAGCAGGAGCTCACAGAGCCGGCTGCGCTGCGAGAC 120
 R K K G F Y K Q E D N K T A W E L P K T

TACGCTCTCCGACCAAGCTCCGACCGCCATGCGCTGCTGCTGCGCATCGAC 180
 V V S P T R V G S G A Y C S S W C S A I D

AGCGCTCAAGGAGCTGCGCATCAGAGCTGACCCGAACCGTTTGCTCCGAGTT 240
 K R S G E K V A I X K L S R P F Q S E T

TTGCGAACCCGACTACCGGAGCTCTGCTGCTGAGACATGAGCTGAGAACCTC 300
 F A E R A Y R E L L L L K H M Q R E N V

ATGGGGCTCTGGATGTTTCACCCGAGCTCTCTCTGCTGAGCTGAGCTGACITCTAC 360
 I G L L D V F T P A S S L R N F Y D F Y

CTGGTGATCCGTTTTCAGACGGATTCAGAGAGCTGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG 420
 L V M P F N Q T D L O K I M G N E F S E

GAGAAGATGCGTACCTGCTGTATCGATGCTCAAAGCTTCTACATCCGCTCTCT 480
 S X I Q Y L V Y Q N L K G L K Y I K S A

GCGCTGCGACGGGACCTGAGACCGGCGACCTGGCTGCTGAGCTGAGCTGAGCTG 540
 G V V H R D L K P G N L A V N E D C E L

AACATTCTGGATTTCGGCTGGCGACATGAGACGCCGAGATGCTGCTGAGCTGAGCTG 600
 K I L D F G L A R H A D A S M T G Y V V

ACCCGCTGCTACGGAGCCCGCGAGCTGATGCTGCTGAGATGCTGAGCTGAGCTG 660
 T R W Y R A P E V I L S W M H Y R Q T V

三

卷之三

133

圖20繪畫

384 ベンヌの傳説

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I
A 61 K 48/00	C 07 K 14/47	14/47
C 07 K 14/47		16/18
	16/18	
C 12 N 1/21	C 12 N 1/21	1/21
C 12 P 21/02	C 12 P 21/02	21/02
C 12 Q 1/02	C 12 Q 1/02	1/02
		1/48
1/48		1/68
1/68		1/68
1/68	C 12 P 21/02	21/02
// C 12 P 21/02	A 61 K 37/02	
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1/02		

(72)発明者 ピーターコナルド・ヤング
アメリカ合衆国08648ニュージャージー州
ローレンスピル、ヘンドリクソン、ロード
92番

【外國語別稿書】

DRUG BINDING PROTEINCross-Reference to Related Applications:

This application is a continuation-in-part application of pending U.S. application Serial No.08/468,982, filed June 6, 1995 which is a continuation-in-part application of U.S. Application Serial No. 08/250,975 filed May 31, 1994 which is a continuation-in-part application of pending U.S. Application Serial Number 08/123,175, filed September 17, 1993, the contents of which are incorporated herein by reference.

Field of the Invention:

This invention relates, *inter alia*, to drug binding proteins, to genes encoding same and to assays and methods for screening pharmaceuticals. More specifically, this invention relates to the Cytokine Suppressive Anti-Inflammatory Drug (CSAID) binding proteins CSSP β , to genes encoding same and to assays and screens useful in the evaluation and characterization of drugs of this pharmacologic class.

Background of the Invention:

Cytokines play an important role in regulating the cellular response during inflammation and other immune functions. Of particular interest are the cytokines interleukin-1 (IL-1, α and β) and tumor necrosis factor (TNF, α and β), which are the intercellular proteins involved in the initial step of the inflammatory response cascade (Arna, et al., *Annu. Rev. Biochem.* 59: 783-836 (1990)). Thus, there has been a substantial amount of research recently devoted to interfering with the production of IL-1 and TNF in response to an inflammatory stimulus.

One therapeutic approach involves suppressing the production of IL-1 and TNF at the level of transcription and/or translation and/or secretion. The activities associated with certain of pyridinyl imidazoles led to a class of compounds referred to as "CSAIDs", or Cytokine Suppressing Anti-Inflammatory Drugs. These compounds appear to arrest the expression of IL-1 and TNF predominantly at the translational level, although a lesser effect on transcription has also been observed but effects on other steps cannot be ruled out.

The pyridinyl imidazole, 5-(4-pyridyl)-6(4-fluorophenyl)-2,3-dihydroimidazo(2,1-b)thiazole (SK&F 86002) was identified as the prototypic CSAID. The basis for its activity has been established and characterized (Lee, et al., *Int'l. J. Immunopharmac.* 10(7): 835-843 (1988); *Agents and Actions* 27(2/4): 277-279 (1989) and *Int'l. J. Immunother.* 6(1):1-12 (1990)). SAR studies suggest that cytokine suppressive effect of the pyridinyl imidazoles

整理番号 159287

represents a unique activity independent of their inhibitory effects on eicosanoid and leukotriene production.

Since the CSAIDs have substantial potential as novel anti-inflammatory therapeutic agents, there is significant interest in characterizing their mechanism of action at the molecular level, as well as obtaining compounds with increased selectivity and potency. Specifically, identification and characterization of the CSAID molecular target would enhance the understanding of the biochemical processes involved in inflammation and aid in the design and screening of more potent anti-inflammatory drugs. This invention discloses, inter alia, the purification and characterization of additional CSAID binding proteins (CSBPs).

Brief Description of the Invention:

The DNAs of this invention, such as the specific sequences disclosed herein, are useful in that they encode the genetic information required for the expression of the novel CSBPs. Additionally, the sequences may be used as probes in order to isolate and identify any additional members of the CSBP β family as well as forming the basis of antisense therapy for disease conditions which are characterized by atypical expression of the CSBP β gene. The novel protein itself is useful directly as a therapeutic or diagnostic agent as well as a component in a screening system for compounds which are antagonists or agonists of CSAID binding activity. The protein is also useful for eliciting antibody production in heterologous species, said antibodies being useful for the aforesaid diagnostic, therapeutic and screening applications. These and additional uses for the reagents described herein will become apparent to those of ordinary skill in the art upon reading this specification.

25 Brief Description of the Figures

Figure 1 illustrates the nucleic acid sequence and amino sequence of a CSBP β .

Detailed Description of the Invention:

Using the information provided herein, such as the polynucleotide sequence set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 1) a polynucleotide of the present invention encoding CSBP β may be obtained using standard cloning and screening procedures, such as those for cloning cDNAs using mRNA from testis and T cells as starting material. Illustrative of the invention, a partial fragment of the polynucleotide set out in Figure 1 was discovered in a cDNA library derived from cells of

登録番号 159287

human testis using the expressed sequence tag (EST) analysis (Adams, M.D., et al. *Science*, (1991), 252:1654-1656; Adams, M.D. et al., *Nature*, (1992), 355:632-634; Adams, M.D., et al., *Nature*, (1993), 377 Suppl:3-174). A longer cDNA corresponding to the sequence in Figure 1 and containing a complete open reading frame for protein translation as indicated 5 was subsequently cloned via hybridization using standard cloning and screening procedures from an activated T cell library.

CSRP9 of the invention is structurally related to other proteins of the CSRP family. The nucleotide sequence encoding the CSRP9 of this invention has about 58-73% identity over its entirety with other human members of the MAP Kinase family.

10 Polynucleotides of the present invention may be in the form of RNA, such as mRNA, or in the form of DNA, including, for instance, cDNA and genomic DNA obtained by cloning or produced by chemical synthetic techniques or by a combination thereof. The DNA may be double-stranded or single-stranded. Single-stranded DNA may be the coding strand, also known as the sense strand, or it may be the non-coding strand, also referred to as the anti-sense strand.

15 The coding sequence which encodes the polypeptide may be identical to the coding sequence of the polynucleotide shown in Figure 1, (SEQ ID NO: 1). It also may be a polynucleotide with a different sequence, which, as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of Figure 1, (SEQ ID NO: 2).

20 Polynucleotides of the present invention which encode the polypeptide of Figure 1 (SEQ ID NO: 2) may include, but are not limited to, the coding sequence for the mature polypeptide, by itself; the coding sequence for the mature polypeptide and additional coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, such as a pre-, or pro- or proprotein sequence; and the coding sequence of the mature polypeptide, with or without the aforementioned additional coding sequences, together with additional, non-coding sequences, including, but not limited to, 25 introns and non-coding 5' and 3' sequences, such as the transcribed, non-translated sequences that play a role in transcription, and mRNA processing, including splicing and polyadenylation signals, for example, for ribosome binding and stability of mRNA. Coding sequences which provide additional functionalities may also be incorporated into the polypeptide. Thus, for instance, the polypeptide may be fused to a marker sequence, such as a peptide, which facilitates purification of 30 the fused polypeptide. In certain preferred embodiments of this aspect of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, such as the tag provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.). As described in Outzis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:821-824, for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. In other embodiments the

整理番号 159287

marker sequence is a HA tag. The HA tag corresponds to an epitope derived of influenza hemagglutinin protein, which has been described by Wilson *et al.*, *Cell*, 1984, 37:757, for instance. Many other such tags are commercially obtainable.

In accordance with the foregoing, the term "polynucleotide encoding a polypeptide" as used herein also encompasses polynucleotides that include a single continuous region or discontinuous regions encoding the polypeptide (for example, interrupted by introns) together with additional regions, that also may contain coding and/or non-coding sequences.

The present invention further relates to variants of the polynucleotides which encode for fragments, analogs and derivatives of the polypeptide having the deduced amino acid sequence of Figure 1 (SEQ ID NO: 2). A variant of the polynucleotide may be a naturally occurring variant such as a naturally occurring allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Such non-naturally occurring variants of the polynucleotide may be made by mutagenesis techniques, including those applied to polynucleotides, cells or organisms.

Among variants in this regard are variants that differ from the aforementioned polynucleotides by nucleotide substitutions, deletions or additions. The substitutions, deletions or additions may involve one or more nucleotides. The variants may be altered in coding or non-coding regions or both. Alterations in the coding regions may produce conservative or non-conservative amino acid substitutions, deletions or additions.

Among the particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polynucleotides encoding polypeptides having the amino acid sequence CSBP β set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 2); variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and fragments of the variants, analogs and derivatives.

Further particularly preferred are polynucleotides encoding CSBP β variants, analogs, derivatives and fragments, and variants, analogs and derivatives of the fragments, which have the amino acid sequence of the CSBP β polypeptide of Figures 1 (SEQ ID NO: 2) in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination. Especially preferred among these are silent substitutions, additions and deletions, which do not alter the properties and activities of the CSBP β . Also especially preferred in this regard are conservative substitutions. Most highly preferred are polynucleotides encoding polypeptides having the amino acid sequence of Figure 1 (SEQ ID NO: 2), without substitutions.

Further preferred embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 75% identical to a polynucleotide encoding the CSBP β polypeptide having the amino acid sequence set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 2), and polynucleotides which are complementary to such

登録番号 159287

polynucleotides. Most highly preferred are polynucleotides that comprise a region that is at least 80% identical to a polynucleotide encoding the CSEBP β polypeptide of the human cDNA of the deposited clone and polynucleotides complementary thereto. In this regard, polynucleotides at least 90% identical to the same are particularly preferred, and those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred and those with at least 98-99% are most highly preferred, with at least 99% being the most preferred.

Particularly preferred embodiments in this respect, moreover, are polynucleotides which encode polypeptides which retain substantially the same biological function or activity as the mature polypeptide encoded by the cDNA of Figure 1 (SEQ ID NO: 2).

The present invention further relates to polynucleotides that hybridize to the polynucleotide encoding a polypeptide of this invention. In this regard, the present invention especially relates to polynucleotides which hybridize under stringent conditions to the herein above-described polynucleotides. As herein used, the term "stringent conditions" means hybridization will occur only if there is at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences.

The polynucleotides of this invention may encode a polypeptide which is the mature protein plus additional amino or carboxyl-terminal amino acids, or amino acids interior to the mature polypeptide (when the mature form has more than one polypeptide chain, for instance). Such sequences may play a role in processing of a protein from precursor to a mature form, may facilitate protein trafficking, may prolong or shorten protein half-life or may facilitate manipulation of a protein for assay or production, among other things. As generally is the case *in situ*, the additional amino acids may be processed away from the mature protein by cellular enzymes.

A precursor protein, having the mature form of the polypeptide fused to one or more prosequences may be an inactive form of the polypeptide. When prosequences are removed such inactive precursors generally are activated. Some or all of the prosequences may be removed before activation. Generally, such precursors are called proproteins.

In sum, a polynucleotide of the present invention may encode a mature protein, a mature protein plus a leader sequence (which may be referred to as a preprotein), a precursor of a mature protein having one or more prosequences which are not the leader sequences of a preprotein, or a proproprotein, which is a precursor to a proprotein, having a leader sequence and one or more prosequences, which generally are removed during processing steps that produce active and mature forms of the polypeptide.

Polypeptides

登録番号 159287

The present invention further relates to a CSB β polypeptide which has the deduced amino acid sequence of Figure 1, SEQ ID NO: 2.

The invention also relates to fragments, analogs and derivatives of these polypeptides. The terms "fragment," "derivative" and "analog" when referring to the polypeptides of Figure 1 (SEQ ID NO: 2), mean a polypeptide which retains essentially the same biological function or activity as such polypeptide, i.e. functions as a CSB β , or retains the ability to bind the ligand or the binding molecule even though the polypeptide does not otherwise function as a CSB β . Thus, an analog includes, for example, a proprotein which can be activated by cleavage of the proprotein portion to produce an active mature polypeptide.

16 The polypeptide of the present invention may be a recombinant polypeptide, a natural polypeptide or a synthetic polypeptide. In certain preferred embodiments, it is a recombinant polypeptide.

17 The fragment, derivative or analog of the polypeptide of Figure 1 (SEQ ID NO: 2) may be (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code; (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group; (iii) one in which the mature polypeptide is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide (for example, polyethylene glycol); or (iv) one in which the additional amino acids are fused to the mature polypeptide, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the mature polypeptide or a proprotein sequence. Such fragments, derivatives and analogs are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

23 Among the particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polypeptides having the amino acid sequence of CSB β set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 2), variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and variants, analogs and derivatives of the fragments. Further particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polypeptides having the amino acid sequence of CSB β , variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and variants, analogs and derivatives of the fragments which retain the CSARD binding activity/function of CSB β .

28 Further particularly preferred in this regard are variants, analogs, derivatives and fragments, and variants, analogs and derivatives of the fragments, having the amino acid sequence of the CSB β polypeptide of Figure 1 (SEQ ID NO: 2), in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1

整理番号 159287

in 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination. Especially preferred among these are silent substitutions, additions and deletions, which do not alter the properties and activities of the CSB β . Also especially preferred in this regard are conservative substitutions. Most highly preferred are polypeptides having the amino acid sequence of Figure 1 (SEQ ID NO: 2) without substitutions.

The polypeptides and polymucleotides of the present invention are preferably provided in an isolated form, and preferably are purified to homogeneity.

The polypeptides of the present invention include the polypeptide of SEQ ID NO: 3 (in particular the mature polypeptide) as well as polypeptides which have at least 80% identity to the polypeptide of SEQ ID NO: 2 and more preferably at least 90% similarity (more preferably at least 95% identity) to the polypeptide of SEQ ID NO: 2 and still more preferably at least 95% similarity (still more preferably at least 99% identity) to the polypeptide of SEQ ID NO: 2 and also include portions of such polypeptides with such portion of the polypeptide generally containing at least 30 amino acids and more preferably at least 50 amino acids.

15 polypeptide fragments

Fragments or portions of the polypeptides of the present invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by peptide synthesis; therefore, the fragments may be employed as intermediates for producing the full-length polypeptides. Fragments or portions of the polymucleotides of the present invention may be used to synthesize full-length polymucleotides of the present invention. Fragments may be "free-standing," i.e., not part of or fused to other amino acids or polypeptides, or they may be comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region. When comprised within a larger polypeptide, the presently discussed fragments most preferably form a single continuous region. However, several fragments may be comprised within a single larger polypeptide. For instance, certain preferred embodiments relate to a fragment of a CSB β polypeptide of the present comprised within a precursor polypeptide designed for expression in a host and having heterologous pre and pro-polypeptide regions fused to the amino terminus of the CSB β fragment and an additional region fused to the carboxyl terminus of the fragment. Therefore, fragments in one aspect of the meaning intended herein, refers to the portion or portions of a fusion polypeptide or fusion protein derived CSB β .

As representative examples of polypeptide fragments of the invention, there may be mentioned those which have from about 5-15, 10-20, 15-40, 30-55, 41-75, 41-80, 41-90, 50-100, 75-100, 90-115, 100-125, and 110-113 amino acids in length.

登録番号 159287

In this context "about" includes the particularly recited range and ranges larger or smaller by several, a few, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid residues at either extreme or at both extremes. For instance, about 40-50 amino acids in this context means a polypeptide fragment of 40 plus or minus several, a few, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid residues to 50 plus or minus several a few, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid residues, i.e., ranges as broad as 40 minus several amino acids to 50 plus several amino acids to as narrow as 40 plus several amino acids to 50 minus several amino acids. Highly preferred in this regard are the recited ranges plus or minus as many as 5 amino acids at either or at both extremes. Particularly highly preferred are the recited ranges plus or minus as many as 3 amino acids at either or at both the recited extremes. Especially particularly highly preferred are ranges plus or minus 1 amino acid at either or at both extremes or the recited ranges with no additions or deletions. Most highly preferred of all in this regard are fragments from about 6-15, 10-20, 15-40, 30-55, 41-75, 41-80, 41-90, 50-100, 75-100, 90-115, 100-125, and 110-113 amino acids long.

Among especially preferred fragments of the invention are truncation mutants of CSRP β . Truncation mutants include CSRP β polypeptides having the amino acid sequences of Figure 1 (SEQ ID NO: 2), or of variants or derivatives thereof, except for deletion of a continuous series of residues (that is, a continuous region, part or portion) that includes the amino terminus, or a continuous series of residues that includes the carboxyl terminus or, as in double truncation mutants, deletion of two continuous series of residues, one including the amino terminus and one including the carboxyl terminus. Particularly preferred fragments of the membrane bound receptors of this invention, include soluble forms of the receptor comprising the extracellular domain without its attendant transmembrane and cytoplasmic domain or transmembrane region deletions resulting a receptor in which the extracellular domain is fused directly to the cytoplasmic domain. See for example, published PCT application number WO94/03620. Fragments having the size ranges set out above also are preferred embodiments of truncation fragments, which are especially preferred among fragments generally.

Also preferred in this aspect of the invention are fragments characterized by structural or functional attributes of CSRP β . Preferred embodiments of the invention in this regard include fragments that comprise alpha-helix and alpha-helix forming regions ("alpha-regions"), beta-sheet and beta-sheet-forming regions ("beta-regions"), turn and turn-forming regions ("turn-regions"), coil and coil-forming regions ("coil-regions"), hydrophilic regions, hydrophobic regions, alpha amphiphilic regions, beta amphiphilic regions, flexible regions, surface-forming regions and high antigenic index regions of CSRP β .

案内番号 159287

Among highly preferred fragments in this regard are those that comprise regions of CSBPs that combine several structural features, such as several of the features set out above. In this regard, the regions defined by the residues about 10 to about 20, about 40 to about 50, about 70 to about 90 and about 100 to about 113 of Figure 1, which all are characterized by amino acid compositions highly characteristic of turn-regions, hydrophilic regions, flexible-regions, surface-forming regions, and high antigenic index-regions, are especially highly preferred regions. Such regions may be comprised within a larger polypeptide or may be by themselves a preferred fragment of the present invention, as discussed above. It will be appreciated that the term "about" as used in this paragraph has the meaning set out above regarding fragments in general.

10 Further preferred regions are those that mediate activities of CSBPs. Most highly preferred in this regard are fragments that have a chemical, biological or other activity of CSBPs, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Highly preferred in this regard are fragments that contain regions that are homologs in sequence, or in position, or in both sequence and in active regions of related polypeptides.

15 It will be appreciated that the invention also relates to, among others, polynucleotides encoding the aforementioned fragments, polynucleotides that hybridize to polynucleotides encoding the fragments, particularly those that hybridize under stringent conditions, and polynucleotides, such as PCR primers, for amplifying polynucleotides that encode the fragments. In these regards, preferred polynucleotides are those that correspond to the preferred fragments, as discussed above.

20 vectors, host cells and expression

The proteins of this invention are preferably made by recombinant genetic engineering techniques. The isolated nucleic acids, particularly the DNAs, can be introduced into expression vectors by operatively linking the DNA to the necessary expression control regions (e.g., regulatory regions) required for gene expression. The vectors can be introduced 15 into the appropriate host cells such as prokaryotic (e.g., bacterial), or eukaryotic (e.g., yeast or mammalian) cells by methods well known in the art (Ausubel et al.,*supra*). The coding sequences for the desired proteins having been prepared or isolated, can be cloned into any suitable vector or replicon. Numerous cloning vectors are known to those of skill in the art, and the selection of an appropriate cloning vector is a matter of choice. Examples of 25 recombinant DNA vectors for cloning and host cells which they can transform include the bacteriophage λ (*E. coli*), pSR322 (*E. coli*), pACYC177 (*E. coli*), pET230 (gram-negative bacteria), pGV1106 (gram-negative bacteria), pLAFR1 (gram-negative bacteria), pME290 (non-*E. coli* gram-negative bacteria), pHV14 (*E. coli* and *Deinococcus subtilis*), pRD9 (Bacillus),

案内番号 159287

pII61 (Streptomyces), pUC8 (Streptomyces), YIp5 (Saccharomyces), a baculovirus insect cell system, , YCp19 (Saccharomyces). See, generally, "DNA Cloning": Vols. I & II, Glover et al., eds. IRL Press Oxford (1985) (1987) and, T. Maniatis et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

- 5 The genes can be placed under the control of a promoter, ribosome binding site (for bacterial expression) and, optionally, an operator (collectively referred to herein as "control" elements), so that the DNA sequence encoding the desired protein is transcribed into RNA in the host cell transformed by a vector containing this expression construction. The coding sequence may or may not contain a signal peptide or leader sequence. The subunit antigen of the present invention can be expressed using, for example, the *E. coli* lac promoter or the protein A gene (spa) promoter and signal sequence. Leader sequences can be removed by the bacterial host in post-translational processing. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,431,739; 4,425,437; 4,338,397.

10 In addition to control sequences, it may be desirable to add regulatory sequences which allow for regulation of the expression of the protein sequences relative to the growth of the host cell. Regulatory sequences are known to those of skill in the art, and examples include those which cause the expression of a gene to be turned on or off in response to a chemical or physical stimulus, including the presence of a regulatory compound. Other types of regulatory elements may also be present in the vector, for example, enhancer sequences.

- 15 As expression vector is constructed so that the particular coding sequence is located in the vector with the appropriate regulatory sequences, the positioning and orientation of the coding sequence with respect to the control sequences being such that the coding sequence is transcribed under the "control" of the control sequences (i.e., RNA polymerase which binds to the DNA molecule at the control sequences transcribes the coding sequence). Modification of the sequences encoding the particular protein of interest may be desirable to achieve this end. For example, in some cases it may be necessary to modify the sequence so that it may be attached to the control sequences with the appropriate orientation, i.e., to maintain the reading frame. The control sequences and other regulatory sequences may be ligated to the coding sequence prior to insertion into a vector, such as the cloning vectors described above.
- 20 Alternatively, the coding sequence can be cloned directly into an expression vector which already contains the control sequences and an appropriate restriction site.

25 In some cases, it may be desirable to add sequences which cause the secretion of the polypeptide from the host organism, with subsequent cleavage of the secretory signal.

整理番号 159287

Alternatively, gene fusions may be created whereby the gene encoding the binding protein of interest is fused to a gene encoding a product with other desirable properties. For example, a fusion partner could provide known assayable activity (e.g., enzymatic) which could be used as an alternative means of selecting the binding protein. The fusion partner could be a structural element, such as a cell surface element such that the binding protein (a normally cytosolic component) could be displayed on the cell surface in the form of a fusion protein. Alternatively, it could be peptide or protein fragment which can be detected with specific antibodies and reagents, and may act as an aid to purification (eg His tag, Glutathione S-transferase fusion). It may also be desirable to produce mutants or analogs of the protein of interest. Mutants or analogs may be prepared by the deletion of a portion of the sequence encoding the protein, by insertion of a sequence, and/or by substitution of one or more nucleotides within the sequence. Techniques for modifying nucleotide sequences, such as site-directed mutagenesis and the formation of fusion proteins, are well known to those skilled in the art. See, e.g., T. Maniatis et al., *supra*; *DNA Cloning*, Vols. I and II, *supra*; *Nucleic Acid Hybridization*, *supra*.

A number of prokaryotic expression vectors are known in the art. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,378,355; 4,440,859; 4,436,815; 4,431,740; 4,431,739; 4,428,941; 4,425,437; 4,418,349; 4,411,594; 4,366,246; 4,342,833; see also U.K. Patent Applications GB 2,121,034; GB 2,008,123; GB 2,007,675; and European Patent Application 163,393. Yeast expression vectors are also known in the art. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,446,235; 4,443,539; 4,430,428; see also European Patent Applications 163,409; 160,561; 96,491. pSV2neo (as described in *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327-341) which uses the SV40 late promoter to drive expression in mammalian cells or pCDNA1neo, a vector derived from pCDNA1 (*Mol. Cell Biol.* 7:4125-29) which uses the CMV promoter to drive expression. Both these latter two vectors can be employed for transient or stable (e.g. using G418 or hygromycin resistance) expression in mammalian cells. Insect cell expression systems, e.g., *Drosophila*, are also useful, see for example, PCT applications US 89/05153 and US 91/06838 as well as EP application 28/304093.3 and Baculovirus expression systems.

Depending on the expression system and host selected, the proteins of the present invention are produced by growing host cells transformed by an expression vector described above under conditions whereby the protein of interest is expressed. The protein is then isolated from the host cells and purified. If the expression system secretes the protein into growth media, the protein can be purified directly from the media. If the protein is not

整理番号 159287

secreted, it is isolated from cell lysates or recovered from the cell membrane fraction. The selection of the appropriate growth conditions and recovery methods are within the skill of the art.

An alternative method to identify proteins of the present invention is by constructing 5 gene libraries, using the resulting clones to transform *E. coli* and pooling and screening individual colonies using polyclonal serum or monoclonal antibodies to the desired binding protein.

The proteins of the present invention may also be produced by chemical synthesis such as solid phase peptide synthesis, using known amino acid sequences or amino acid 10 sequences derived from the DNA sequence of the genes of interest. Such methods are known to those skilled in the art. Chemical synthesis of peptides is not particularly preferred. assays

This invention also provides a method for determining whether a ligand previously 15 known to bind to a CSEBP β can bind to such a protein. The method comprises contacting the ligand to be identified with cytosolic fraction from mammalian cells and measuring its ability to compete with a known radioactive CSAID, in a CSAIDs binding assay (Lee et. al *Nature* 372:739-746; and previous CSEBP filings). Alternative methods include contacting the ligand to be identified with a whole-cell expressing the coding sequence of a CSEBP β under conditions sufficient for binding of ligands previously identified as binding to such a receptor. In other 20 embodiments cell membrane or cytosolic fractions comprising CSEBP β fusions or isolated CSEBP β free or immobilized on solid supports may be used to measure binding of the ligand to be tested. When recombinant cells are used for purposes of expression of the CSEBP β it is preferred to use cells with little or no endogenous CSEBP β activity so that binding if any is due 25 to the presence of the expressed protein of interest. Alternatively, the CSEBP β is engineered as a fusion to a peptide or protein fragment allowing separation from endogenous cellular proteins which might contribute to binding. As mentioned previously, a specifically designed indicator of receptor binding can be constructed. For example a fusion protein can be made by fusing the CSEBP β of this invention with a protein domain which is sensitive to CSEBP β /ligand binding. Such a domain referred to here as an indicator domain is capable, itself, or in 30 association with accessory molecules, of generating an analytically detectable signal which is indicative of receptor ligand binding. A variation of this approach is to express CSEBP β as a fusion protein (e.g., fused to FLAG peptide) in THP.1 or other mammalian cells, and to use the fusion peptide as a means of isolating the recombinant CSEBP β after suitable stimulation

登録番号 159287

and pretreatment of THP.1 cells. Such expression can be achieved with numerous mammalian expression vectors which utilize viral promoters, e.g. CMV, RSV and polyadenylation sequences, et. SV40, bovine growth hormone, and a selectable marker such as G418 or hygromycin for selection of stable transfectants.

5 Cytosolic preparations from transfected or transformed cells expressing such fusions may be employed. All of the above techniques that are useful for ligand identification are also useful in drug screening and drug development protocols.

Alternatively, the purified recombinant protein could be used to substitute for crude THP.1 cell lysates in a competitive binding assay with SB 202190 or a related compound 10 (Lee et al., Nature 372:739-746). This assay is useful to screen for novel compound which bind CSRP β , or as a way to assess alterations to compound which is known to bind. The availability of purified protein allows alternative configurations of the assay from those described previously for the crude material. For example, if the protein is covalently linked to a tag, such a protein binding site for configuration in a colometric assay, e.g., conjugated 15 antibody, or to an enzyme for direct detection of enzymic activity, e.g., horseradish peroxidase or alkaline phosphatase, binding to novel compounds displayed on a solid matrix could be detected. Such compounds could include low molecular weight organic molecules, peptides, peptoids, and proteins. In the latter case, the protein can be used as a way to isolate other 20 proteins in its signaling cascade, for example, those that are in the pathway for activation of cytokine translation in activated monocytes. The protein may also be used to isolate naturally occurring regulatory molecules within mammalian cells that act by a CSRP β binding mechanism. Finally, the protein can be used to identify target peptides displayed on the surface of phage.

The knowledge that the CSRP β encodes protein kinase suggests that recombinant 25 forms can be used to establish a protein kinase activity. Typically this would involve the direct incubation of CSRP β with a protein or peptide substrate in the presence of $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, followed by the measurement of radioactivity incorporated into the substrate by separation and counting. Separation methods include immunoprecipitation, conjugation of substrate to a 30 bead allowing separation by centrifugation or determination of incorporation by scintillation proximity assay, SDS-PAGE followed by autoradiography or bioluminescence analysis. While the specific substrates are not yet known, candidates include CSRP β itself (autophosphorylation), myelin basic protein, ATP2, MAPKAP kinase-2, MAPKAP kinase-3 (see McLaughlin et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:8488-8492 and references therein) and peptides related to known

登録番号 159287

MAP kinase substrates. Other substances might be discovered by incubating CSB β with random peptides conjugated to solid supports or displayed by phage (see above) or by incubation of CSB β with mammalian cell lysates (e.g. THP.1 cell lysates) and $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, followed by separation of the labelled target proteins, and sequencing. Kinase activity may 5 also be detected by use of antiphosphotyrosine antibodies. The protein kinase activity of CSB β may require incubation with a specific MAP kinase kinase. This may be achieved by preincubating CSB β with lysates from stimulated eukaryotic cells (e.g., LPS treated THP.1 cells) and ATP. Alternatively, it may be possible to isolate a more active form of CSB β from HOG1 deletion strains of yeast expressing the human CSB β and grown in high 10 osmolarity conditions (see for example Kumar et al., (1993) J. Biol. Chem. 270:29043-29046).

These assays permit the discovery and modification of compounds which inhibit 15 CSB β kinase activity *in vitro*, a known property of CSAIDS (Lox et al., *Nature*, supra). Such compounds will block cytokine synthesis in a comparable fashion to the compounds described herein. They could also lead to the discovery of novel substrates which themselves may be viable targets for discovery of novel compounds which block cytokine production.

It is expected that CSB β s, like other MAP kinases, will be activated by a MAP kinase kinase, hence the recombinant protein would allow the establishment of a second assay which measures the ability of CSB β to be phosphorylated by putative MAP kinase kinases. 20 In this case fractions from stimulated cell lysates (eg THP.1 cells stimulated with LPS) are incubated with CSB β in the presence of $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, and the incorporation of ^{32}P -label into CSB β measured by separation and counting. Separation can be achieved in a number of ways: one way is to use a CSB β fused to a peptide or protein and separate via affinity chromatography or immunoprecipitation with the peptide or protein directed antibody. 25 Alternatively, the CSB β can be directly conjugated to beads or bound through a fusion peptide or protein (e.g., FLAG (peptide), glutathione-S-transferase) and separated by centrifugation after incubation with cell lysates. Also tyrosine phosphorylation of CSB β could be detected by immunoprecipitation or immunoblot with commercially available anti-phosphotyrosine antibodies.

30 These assays can be used to discover compounds which block the activation of CSB β protein kinase activity and to improve the potency of already discovered compounds.

登録番号 159287

These compounds would be expected to have utility due to their blocking of cytokine synthesis.

The ability of human CSBP β to rescue a HOG1 deletion strain upon growth in conditions of high osmolarity allows for the direct screening of compounds which block 5 CSBP β activity *in vivo*. For example, compounds could be screened for their ability to block growth of a CSBP β +/HOG1- yeast strain in high osmolarity but which have no effect on growth of the same strain in standard osmolarity or on a CSBP β -HOG1+ in high osmolarity. The sensitivity of the yeast based assay can be increased by introducing host mutations that affect the cell membrane and permeability (Gaber, et al., Mol. Cell. Biol. 9: 3447-3456, 10 1989).

In a compound screening embodiment of this invention, the CSBP β in isolated, immobilized or cell bound form is contacted with a plurality of candidate molecules and those candidates are selected which bind to and interact with the protein. The binding or interaction can be measured directly by using radioactively labeled candidate of interest or indirectly by 15 measuring an effect resulting from the interaction or binding of the candidate compound. Alternatively, the candidate compounds can be subjected to a competition screening assays, in which a known ligand, preferably labeled with an analytically detectable reagent, most notably radioactivity, is introduced with the compounds to be tested and the compound's capacity to inhibit or enhance the binding of the labeled ligand is measured. Compounds are screened for 20 their increased affinity and selectivity for the CSBP β .

To illustrate this aspect of the invention, a natural product screen may be performed.

The standard assay in which bound ligand is separated from free by exclusion chromatography using mini-columns is used to initiate a screening effort. Marine extracts, microbial extracts and extracts of plant material may be tested for inhibition of a 3 H-CSA10 binding to THP.1 cytosol. Extracts are confirmed as antagonists if binding is characterized by IC₅₀'s of around 80-200 μ g/ml. A low hit-rate coupled with the failure to observe inhibition by any of a selected group of "nuisance extracts" indicates that the assay is sufficiently selective and robust to support a screening effort.

Further refinement of the binding assay to facilitate high throughput screening can be 30 achieved by the minor modification of separating bound ligand from free ligand using spin columns.

Inhibitors

発明番号 159287

The discovery that the CSBP β of this invention is homologous to the CSBP-MAP kinase family of serine-threonine protein kinases provides a specific rationale for the treatment of a wide variety of acute and chronic inflammatory diseases. Accordingly, it is a further aspect of this invention to treat patients suffering from the effects of cytokine-mediated inflammatory disease with a CSBP β inhibitory amount of a NSAID. Illustrative examples of such diseases include, without limitation, diseases associated with the central nervous system such as acute dementia of the Alzheimer's type (SDAT), multiple sclerosis, cerebral malaria, stroke, head trauma and spinal cord injury; cardiovascular diseases such as restenosis and atherosclerosis; inflammatory diseases such as Adult Respiratory Disease Syndrome (ARDS), 5 Rheumatoid arthritis, Osteoarthritis, Inflammatory Bowel Disease (IBD), psoriasis, dermatitis, asthma; and other such diseases or conditions associated with dysregulated or excess cytokines such as osteoporosis, sepsis due to surgical or traumatic incident, chronic renal failure, AIDS, cachexia and autoimmune conditions such as lupus erythematosus, host graft rejection and graft versus host disease. Thus this invention contemplates the treatment 10 and/or amelioration of such disease by administering a CSBP β inhibiting amount of a compound. Without wishing to be bound by any particular theory of the functioning of the CSBP β s of this invention, it is believed that among the useful inhibitors of CSBP β function are those compounds which inhibit the kinase activity of the CSBP β s. Other sites of inhibition are, of course, possible owing to its position in a signal transduction cascade. 15 Therefore, inhibiting the interaction of CSBP β with one or more of its upstream or downstream substrate is also contemplated by this invention.

compositions/administration

This invention also contemplates pharmaceutical compositions comprising compounds when identified by the above methods and a pharmaceutically acceptable carrier. 20 Pharmaceutical compositions of pharmaceutical drugs of this invention are particularly useful for parenteral administration, i.e., subcutaneously, intramuscularly or intravenously. The compositions for parenteral administration will commonly comprise a solution of the compounds of the invention or a cocktail thereof dissolved in an acceptable carrier, preferably an aqueous carrier. A variety of aqueous carriers may be employed, e.g., water, buffered water, 0.4% saline, 0.3% glycine, and the like. These solutions are sterile and generally free of particulate matter. These solutions may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions such as pH

整理番号 159287

adjusting and buffering agents, etc. The concentration of the compound of the invention in such pharmaceutical formulations can vary widely, i.e., from less than about 0.5%, usually at or at least about 1% to as much as 15 or 20% by weight and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, etc., according to the particular mode of administration selected.

Thus, a pharmaceutical composition of the invention for intramuscular injection could be prepared to contain 1 ml. sterile buffered water, and 50 mg of a compound of the invention. Similarly, a pharmaceutical composition of the invention for intravenous infusion could be made up to contain 250 ml of sterile Ringer's solution, and 150 mg of a compound of the invention. Actual methods for preparing parenterally administrable compositions are well known or will be apparent to those skilled in the art and are described in more detail in, for example, Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

The compounds described herein can be lyophilized for storage and reconstituted in a suitable carrier prior to use. This technique has been shown to be effective with conventional proteins and art-known lyophilization and reconstitution techniques can be employed.

In situations where the identified drug is non-proteinaceous, it may be administered alone or in combination with pharmaceutically acceptable carriers. The proportion of which is determined by the solubility and chemical nature of the compound, chosen route of administration and standard pharmaceutical practice. For example, they may be administered orally in the form of tablets or capsules containing such excipients as starch, milk sugar, certain types of clay and so forth. They may be administered sublingually in the form of troches or lozenges in which the active ingredient is mixed with sugar and corn syrups, flavoring agents and dyes; and then dehydrated sufficiently to make it suitable for pressing into a solid form. They may be administered orally in the form of solutions which may be injected parenterally, that is, intramuscularly, intravenously or subcutaneously. For parenteral administration, they may be used in the form of a sterile solution containing other solutes, for example, enough saline or glucose to make the solution isotonic.

The physician will determine the dosage of the present therapeutic agents which will be most suitable and it will vary with the form of administration and the particular compound chosen, and furthermore, it will vary with the particular patient under treatment. The physician will generally wish to initiate treatment with small dosages substantially less than the optimum dose of the compound and increase the dosage by small increments until the optimum effect under the circumstances is reached. It will generally be found that when the

整理番号 159287

composition is administered orally, larger quantities of the active agent will be required to produce the same effect as a smaller quantity given parenterally. The compounds are useful in the same manner as other serotonergic agents and the dosage level is of the same order of magnitude as is generally employed with these other therapeutic agents. The therapeutic dosage will generally be from 1 to 10 milligrams per day and higher although it may be administered in several different dosage units. Tablets containing from 0.5 to 10 mg. of active agent are particularly useful.

Depending on the patient condition, the pharmaceutical composition of the invention can be administered for prophylactic and/or therapeutic treatments. In therapeutic application, compositions are administered to a patient already suffering from a disease in an amount sufficient to cure or at least partially arrest the disease and its complications. In prophylactic applications, compositions containing the present compounds or a cocktail thereof are administered to a patient not already in a disease state to enhance the patient's resistance.

Single or multiple administrations of the pharmaceutical compositions can be carried out with dose levels and pattern being selected by the treating physician. In any event, the pharmaceutical composition of the invention should provide a quantity of the compounds of the invention sufficient to effectively treat the patient.
probes

The nucleic acid embodiment of this invention is particularly useful in providing probes capable of specific hybridization with human CSBPS sequences. Probing technology is well known in the art, and it is appreciated that the size of the probes can vary widely, but it is preferred that the probe be at least 15 nucleotides in length. It is also appreciated that such probes can be, and are preferably, labeled with an analytically detectable reagent to facilitate identification of the probe. Useful reagents include, but are not limited to, radioactivity, fluorescent dyes or enzymes capable of catalyzing the formation of a detectable product. This invention contemplates, for example using receptor encoding probes in the diagnostic evaluation of disease states characterized by an abnormal, i.e. increased or decreased level of receptor gene expression. Alternatively, the probes can be used to identify individuals carrying chromosomal or molecular mutations in the gene encoding the receptor. Depending on the conditions employed by the ordinary skilled artisan, the probes can be used to identify and recover additional examples of this receptor (in its genomic or cDNA form).

案内番号 159267

from other cell types and individuals. As a general rule, the more stringent the hybridization conditions, the more closely related the genes will be that are recovered.

antisense

Also within the scope of this invention are antisense oligonucleotides predicated upon the sequences disclosed herein for the CSBP β . Synthetic oligonucleotides or related antisense chemical structural analogs are designed to recognize and specifically bind to a target nucleic acid encoding the receptor gene and inhibit gene expression, e.g., the translation of the gene when the target nucleic acid is mRNA. Although not wishing to be bound to a particular theory for the mechanism of action of antisense drugs, it is believed that such drugs can act by one or more of the following mechanisms: by binding to mRNA and inducing degradation by endogenous nucleases such as RNase I or by inhibiting the translation of mRNA by inhibiting its binding to regulatory factors or ribosomal components necessary for productive protein synthesis. Additionally, the antisense sequences can be used as components of a complex macromolecular arrays in which the sequences are combined with ribozyme sequences or reactive chemical groups and are used to specifically target mRNAs of interest and degrade or chemically modify said mRNAs. The general field of antisense technology is illustrated by the following disclosures, which are incorporated herein by reference for purposes of background (Cohen, J.S., Trends in Pharm. Sci. 10:435 (1989) and Weintraub, H.M. Scientific American Jan. (1990) at page 40).

20 gene therapy

This invention also contemplates the use of the DNA sequences disclosed herein in gene therapy. Because CSBP β is a protein kinase, it is possible to make a site specific mutant which is inactive as a kinase, but will block activation of the endogenous CSBP β when coexpressed in the same cell, i.e., it is a dominant negative mutant (Kolch et al., Nature 342: 426-428 (1993)). The DNA encoding this mutant protein could be used in gene therapy to reduce chronic inflammation. There are many vector and delivery systems available to direct DNA into target cells *in vivo*, e.g. adenovirus, retroviruses.

antibodies

30 This invention also contemplates antibodies, monoclonal or polyclonal directed to epitopes corresponding to amino acid sequences disclosed herein from the CSBP β . Particularly important regions of the receptor for immunological purposes are those regions associated with ligand binding domains of the protein. Antibodies directed to the regions are

登録番号 159287

particularly useful in diagnostic and therapeutic applications because of their effect upon protein-ligand interaction. Methods for the production of polyclonal and monoclonal antibodies are well known, see for example Chap. 11 of Ausubel et al. (*supra*).

This invention also provides pharmaceutical compositions comprising an effective amount of antibody or fragment thereof directed against the CSBP β to block binding of the naturally occurring ligands to that protein in order to treat or ameliorate disease states associated with protein activation.

The binding proteins of the present invention or their fragments comprising at least one epitope can be used to produce antibodies, both polyclonal and monoclonal. If polyclonal antibodies are desired, a selected mammal, (e.g., mouse, rabbit, goat, horse, etc.) is immunized with a binding protein of the present invention, or its fragment, or a mutated binding protein. Serum from the immunized animal is collected and treated according to known procedures. When serum containing polyclonal antibodies is used, the polyclonal antibodies can be purified by immunoaffinity chromatography or other known procedures.

Monoclonal antibodies to the proteins of the present invention, and to the fragments thereof, can also be readily produced by one skilled in the art. The general methodology for making monoclonal antibodies by using hybridoma technology is well known. Immortal antibody-producing cell lines can be created by cell fusion, and also by other techniques such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. See, e.g., M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies" (1980); see also U.S. Patent Nos. 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,452,570; 4,465,917; 4,472,500; 4,491,632; and 4,493,890. Panels of monoclonal antibodies produced against the protein of interest, or fragment thereof, can be screened for various properties; i.e., for isotype, epitope, affinity, etc. Alternatively, genes encoding the monoclonals of interest may be isolated from the hybridomas by PCR techniques known in the art and cloned and expressed in the appropriate vectors. Monoclonal antibodies are useful in purification, using immunoaffinity techniques, of the individual proteins against which they are directed. The antibodies of this invention, whether polyclonal or monoclonal have additional utility in that they may be employed reagents in immunoassays, RIA, ELISA, and the like. In addition they can be used to isolate the CSBP β from human cells and determine the effect of different stimuli and compounds on the phosphorylation state and protein kinase activity of endogenous CSBP β . The antibodies could be used to establish a tissue culture

整理番号 159287

based assay for discovery or modification of novel compounds which block the phosphorylation or kinase activity of CSBP β . An example of such an assay would be to incubate human cell lines expressing CSBP β with a compound or compound mixture prior to treatment with a suitable LPS stimulus (e.g., LPS, osmotic stress) for a defined time period, followed by immunoprecipitation of CSBP β with antibody and assessment of its phosphorylation state via immunoblot or chromatography or measurement of its kinase activity with appropriate protein or peptide substrate.

transgenics

- 10 Transgenic, non-human, animals may be obtained by transfecting appropriate fertilized eggs or embryos of a host with nucleic acids encoding the CSBP β disclosed herein, see for example U.S. Patents 4,736,866; 5,175,385; 5,175,384 and 5,175,386. The resultant transgenic animal may be used as a model for the study of CSBP β /ligand interaction. Particularly, useful transgenic animals are those which display a detectable phenotype associated with the expression of the protein. Drugs may then be screened for their ability to reverse or exacerbate the relevant phenotype. This invention also contemplates operatively linking the CSBP β coding gene to regulatory elements which are differentially responsive to various temperature or metabolic conditions, thereby effectively turning on or off the phenotypic expression in response to those conditions.
- 15 The nucleic acid probes disclosed herein can be used to clone the cognate version of the human CSBP β gene from a desired experimental animal species; for example the murine version. Strains of mice can be developed in which said gene has been eliminated by conventional gene knock-out technology. The gene can then be substituted/or replaced by the human CSBP β DNA of this invention to yield a mouse for screening candidate drugs *in vivo*.
- 20 Similar gene knockout and human protein inhibition studies can also be performed with yeast.

EXAMPLES

The present invention is further described by the following examples. The examples are provided solely to illustrate the invention by reference to specific embodiments. These exemplifications, while illustrating certain specific aspects of the invention, do not portray the limitations or circumscribe the scope of the disclosed invention.

Certain terms used herein are explained in the foregoing glossary.

整理番号 159287

All examples are carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. Routine molecular biology techniques of the following examples can be carried out as described in standard laboratory manuals, such as Sambrook *et al.*

5

Example 1 - Tissue distribution

A Northern blot was conducted with a partial CSBP β cDNA above on a human multiple tissue Northern from Clontech. Conditions used have been reported previously (Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Bhambhani, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, L. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., and Young, P. R. (1994) *Nature* 372, 739-746). CSBP β was expressed most abundantly in human testis, with lower expression in pancreas, prostate and small intestine. Weak expression was noted in spleen, thymus, PBL, and skeletal muscle.

登録番号 159287

Example 2 - Homology to MAP kinase family and expression

CSBP β is a member of the MAP kinase family of serine-threonine protein kinases (Marshall, C. J. (1994) *Curr. Opinion Genet. Develop.* 4, 82-89). Members of the MAP kinase family are characterized by having a "TxY" amino acid motif (T=Threonine, Y=tyrosine and X is any amino acid) in an activation loop near to the active site. Phosphorylation of both the tyrosine and threonine by a MAP kinase kinase in response to an appropriate stimulus is required for the activation of MAP kinase activity. There are three families of MAP kinases which are distinguished by the nature of the "x" amino acid and the size of the activation loop (Cano, E., and Mahadevan, L. C. (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20, 117-122). Hence, the cdk5s have TEY, JNK/SAPKs have TPY and the CSBP/p38s have TGY. These differences reflect differences in the activating MAP kinase kinases and in the cellular stimuli which activate each MAP kinase. Within each family, the activating stimuli appear to be very similar. Thus the cdk5s respond mostly to mitogenic stimuli (e.g., BGF, PDGF), while the JNK/SAPKs and CSBP/p38s respond to several cellular stresses (eg UV, osmotic, heat or chemical stress, hypoxia, oxidants etc) and proinflammatory stimuli (e.g., LPS, IL-1, TNF, etc.).

Recently, several new forms of CSBP have been identified. In addition to the two splice variants of CSBP, CSBP1 and CSBP2, a further spliced variant was identified through a yeast two-hybrid interaction screen with the nuclear protein Max (Zervos, A. S., Fazio, L., Gaito, J. P., Kyriakis, J. M., and Brent, R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10531-10534). Two homologues with significant amino acid identity which also retain the "TOY" motif characteristic of the CSBP family were also recently identified: p38 β (Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S., and Han, J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 17920-17926), and ERK6/SAPK3 (Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J.-F., Moller, N. P. H., and Ulrich, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4355-4359; Mertens, S., Craxton, M., and Goedert, M. (1996) *FEBS Lett.*, (In press).

CSBP β may be engineered for yeast expression in a similar manner to that previously described for CSBP1 and CSBP2 (Kumar, S., McLaughlin, M. M., McDonnell, P. C., Lee, J. C., Lim, G. P., and Young, P. R. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 29043-29046). An XbaI site is engineered at the initiation codon of CSBP β by the polymerase chain reaction (Mullis and Faloona, *Meth. Enzymol.* 155:335-50 (1987)). An XbaI/BglII fragment containing CSBP β is

整理番号 159287

them ligated into the same sites in p138NU, a modification of p138NB (McHale et al. Mol. Pharm. 39:109-113 (1991)) in which the Trp selectable marker is replaced with URA3. Alternatively, the amino terminus of CSBP β can be fused to an epitope tag such as the FLAG epitope (for which reagents are available from IBI-Kodak) by using a polymerase chain reaction which includes an XbaI site, the FLAG epitope and the amino terminal nucleotide sequence of CSBP β .

CSBP β can also be engineered for expression in mammalian cells such as HeLa and JURKAT by fusing the amino terminus of CSBP β with a FLAG epitope. An XbaI/XbaI restriction fragment containing the complete open reading frame of human CSBP β was excised from the Bluescript plasmid in which it was originally cloned, and inserted into the vector pSPORT (GIBCO-BRL) cut with XbaI and SstI. The resulting vector pSPORT-CSBP β was then cut with SacI and BamHI and ligated with a synthetic oligonucleotide linker prepared by hybridizing together the following two oligonucleotides: 5' GAT CCG GTA CCA TGG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAA GCC TCA TCC GGA AAA AGG 15 GCT TCT ACA AGC AGG AGC T - 3' (SEQ ID NO: 3) and 5'-CCT GCT TGT AGA AGC CCT TTT TCC GGA TGA GGC TTT TAT CAT CAT CAT CAT CTT TAT AAT CCA 'TGG TAC CG - 3' (SEQ ID NO: 4) to create pSPORT-FLAGCSBP β . The entire FLAG-CSBP β fusion was then excised from pSPORT-FLAG CSBP β on a HindIII/SmaI restriction fragment, and ligated into pCDN cut with HindIII and EcoRV to create pCDN-FLAGCSBP β . This could then be transfected into mammalian cells such as HeLa or JURKAT using a number of established protocols, eg lipofectamine (GIBCO-BRL). Treatment of cells with a suitable stimulus (eg osmotic shock, UV, IL-1) leads to activation of the FLAG-CSBP β , and CSAID binding can be detected through the ability of CSAIDs to inhibit the kinase activity of CSBP β . Thus, FLAG CSBP β can be immunoprecipitated from transfected mammalian cells with antibodies to the FLAG epitope (IBI-Kodak), and an in vitro kinase assay can be performed with a suitable substrate (eg myelin basic protein, MAPKAP kinase-2 or -3) in the presence or absence of CSAID as previously described (Lee et al., (1994) Nature 372:739-746, McLaughlin et al. J. Biol. Chem. 271:8488-8492 (1996)).

登録番号 159287

Example 1. Expression in E. coli:

To confirm that the proteins encoded by the isolated cDNAs of this invention can bind to CSAIDs, the cDNA may be expressed in *E. coli*, yeast and mammalian cells (e.g., HeLa, CHO, 3T3). In *E. coli* the CSAIDs are expressed as fusion proteins, for example, with
5 β-galactosidase, an enterokinase cleavable FLAG epitope tag, glutathione S-transferase or a hexaHistidine tail. (FLAG is a commercial epitope for which reagents are available through IBG-Kodak). In the latter case this is achieved by the design of a synthetic oligonucleotide linker with an initiation site, antibody recognition sequence, and enterokinase cleavage site. Proteins are expressed under the control of either the pLac (e.g., Bluescript KS vector from
10 Stratagene, LaJolla, CA.) or λPL (Shatzman, et al., N.Y. Acad. Sci., 478: 233-248 (1986))
promoters and probed with a radiophotaffinity CSAID shown to specifically crosslink
proteins of the expected sizes in cell lysates.

Protein expressed in *E. coli* is purified by passage over an affinity matrix containing
a monoclonal antibody to the FLAG epitope, glutathione beads or a NiNTA column
15 according to manufacturer's instructions.

登録番号 159287

SEQUENCE LISTING

(I) GENERAL INFORMATION

(i) APPLICANT: McDonnell, Peter
Young, Peter

(ii) TITLE OF THE INVENTION: DRUG BINDING PROTEIN

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: SmithKline Beecham Corporation
(B) STREET: 700 Swedeland Road
(C) CITY: King of Prussia
(D) STATE: PA
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 19406-0939

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Diskette
(B) COMPUTER: IBM Compatible
(C) OPERATING SYSTEM: DOS
(D) SOFTWARE: FastSEQ Version 1.5

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/468,962
(B) FILING DATE: 06-JUN-1995

(A) APPLICATION NUMBER: 08/123,175
(B) FILING DATE: 37-SEP-1993

(A) APPLICATION NUMBER: 08/260,875
(B) FILING DATE: 31-MAY-1994

整理番号 159287

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

- (A) NAME: Schreck, Patricia A
- (B) REGISTRATION NUMBER: 33,777
- (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: ATG55036

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

- (A) TELEPHONE: 610-270-5631
- (B) TELEFAX: 610-270-5690
- (C) TELEX:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1838 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

GCCAGGAGTC AGTGGCGACG CGGGGGCGCT CGAGATCGG TCGCGCGAT GAGCCCTCATC	60
CGGAAAGGCG CCTTTTACAA CGAGGAGTC AACAGAGCGG CCTCGCGACT CGGCAAGACG	120
TGGCTCGCC CGAGGCGCTT CGGGGGCGCG CCTTGATCGCT CGCTGTCTCGT CGGCAATCGAC	180
AGGGGCTTG CGGGGGCGGT CGGCAATCGAG AACCTGAGCC GAGCTTTTCA CTGGAGAGATT	240
TTGGCGAACG CGGGGGCGACG CGGGGGCGTG CGGGGGCGAC ACATGCGACCA TGAGGAGCGTC	300
ATGGGGCTCC TTGGATGTTT CACGGGAGGC TGTCTCGCC GAGACTTCTA TGACTTCTAC	360
CGGGGGCGTG CCTTGATCGA GACGGGATCG CGAGGAGTC CGGGGGCGTA GTTCAGTGGG	420
GAGGAGATCC AGTGGCTGGT CTGAGGAGTC GAGCTTGCTG TTGGAGACAT CGGGGGCGCT	480
CGGGGGCGTG AGAGGGAGCT CGGGGGCGACG AACCTGGCTG TGTCTGAGGA CTGTTGAGTC	540
AGGGGCTTG TTGGATGCTT CGGGGGCGAT CGAGGAGCTG CGGGGGCGTG CTGGGGCTG	600
ACGGGGCTGGT AGGGGGCGCTT CGGGGGCGACG TTGGAGACAT CGGGGGCGCTG	660
CGGGGGCGTG CGGGGGCGTG TGTCTGAGGA GAGCTTGCTG CGGGGGCGCTG	720
GGGGAGGGTT AGCTGGAGCA CGGGGGCGACG ATGGGGATCG TGAGGAGCTG CGGGGGCGTG	780
CGGGGGCGTG AGGGGGCGCTT CGGGGGCGACG CGGGGGCGTG CGGGGGCGCTG	840
ACGGGGCTGGT CGGGGGCGACG TTGGAGACAT CGGGGGCGCTG CGGGGGCGTG	900
CGGGGGCGTG CGGGGGCGACG TTGGAGACAT CGGGGGCGCTG CGGGGGCGTG	960
CGGGGGCGTG CGGGGGCGACG TTGGAGACAT CGGGGGCGCTG CGGGGGCGTG	1020

卷之三 159287

CATCCCTCTT TTGAAACCCCTT	CGGGGACCCCT	GAGGAGAGA	CTTGAGGCCCC	GCAGGGGTTT	1020
GATTTTCTT TAGAACACCA	GAATCTCACA	CTGGGTGAAAT	GGAGGAGCA	CATTCTCAAS	1060
GAGTTGCTGA ACTTCAGCCC	CATTGCGCG	AAGGACTCAC	GGXXXXGGAC	TGCGCTGAG	1140
CTGCTNAGAC TGTCTTGC	TGCGGACCGC	GGCGAGACAC	TGCGGAGGA	CCACTATTTG	1200
TCACTTACCA ACTCGGGCTT	TUTTGGATA	CAGGCTTTC	AGCGCGGAC	AGAAGGGTCC	1260
TTCTCTTAT GTGCGAAATG	GGCGTAGTAG	ATGCCGAAATT	CAAGGTGTC	GGTGGGAAA	1320
AGCTTACGTT GATGCTAAC	GGCGAAGTTA	ARCTGCCAT	CTGGGGATC	GGCTTGAGGT	1380
GGGGGCGCTTT CCTTCCCGCC	AGAGTGGGGC	TGCTGGGGG	CTGAGCGAGG	GGGGGGGGCT	1440
ATGCGCTGAA TGCTGTGTTG	GTTCCTAGG	CATGGCTCAA	CGATTCACCA	CAAAACCTGT	1500
CGATTCGAAAC AGCGGAACTT	CGTCCCGTTA	CAGTTCTGAA	GGCTGGAAAT	YTGGCGATGAA	1560
GGTGGTGGAA CGGGCTGCTT	CCCTTTCAGG	GGCTCTGGGA	AGAGTCCTTC	CTGGGGCTTT	1620
TTTACCTTGT GUCGGCGTGT	GGCGCTGCTT	GGCATTCCCC	AGGTTCCTTC	TGCTCTACTC	1680
CAGCTCTGT CTCTTCTTT	CTCTCTCTT	TTAACAAACAG	TCATTCGATT	TAGGGGGCAC	1740
CCTTATCTG TGTGATTTTA	TTTGGATCTT	TATTAATTAAC	ACCTGGAAT	ACTCTAATTC	1800
CGAAATGAGT CACATCTCA	GGTTCCAGGT	GGCATGTA			1838

(3) INFORMATION FOR SED ID NO: 2:

(iii) SEISMIC CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 365 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
 - i) MOLECULE TYPE: peptide
 - ii) HYPOTHETICAL: NO
 - iv) ANTISENSE: NO
 - v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
 - vi) ORIGIN: OTHER

(x3) SOURCE/DESCRIPTION: SDO ID NO:3:

整理番号 159287

	85	90	95
Leu Arg Asn Phe Tyr Asp Phe Tyr	Leu Val Met Pro	Val Met Glu Thr	
100	105	110	
Asp Leu Gln Lys Ile Met Gly Met	Glu Phe Ser	Glu Glu Lys Ile Glu	
115	120	125	
Tyr Leu Val Tyr Glu Met Leu Lys	Tyr Ile His Ser Ala		
130	135	140	
Gly Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro	Gly Asn Leu Ala Val Asn Glu		
145	150	155	160
Asp Cys Glu Leu Lys Ile Leu Asp	Phe Gly Leu Ala Arg His Ala Asp		
165	170	175	
Ala Glu Met Thr Gly Tyr Val Val Thr	Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu		
180	185	190	
Val Ile Leu Ser Trp Met His Tyr Asn Glu Thr Val Asp	Ile Trp Ser		
195	200	205	
Val Gly Cys Ile Met Ala Glu Met Leu Thr	Gly Lys Thr Leu Phe Lys		
210	215	220	
Gly Lys Asp Tyr Leu Asp Glu Leu Thr Glu Ile	Leu Lys Val Thr Gly		
225	230	235	240
Val Pro Gly Thr Glu Phe Val Glu Lys Leu Asn Asp	Lys Ala Ala Lys		
245	250	255	
Ser Tyr Ile Glu Ser Leu Pro	Gln Thr Pro Arg Lys Asp	Pro Phe Thr Gln	
260	265	270	
Leu Phe Pro Arg Ala Ser Pro	Gln Ala Ala Asp	Leu Leu Glu Lys Met	
275	280	285	
Leu Glu Leu Asp Val Asp Lys Arg	Leu Thr Ala Ala Glu Ala Leu Thr		
290	295	300	
His Pro Phe Phe Glu Pro Phe Arg Asp Pro	Glu Glu Glu Thr Glu Ala		
305	310	315	320
Gln Gln Pro Phe Arg Asp Ser	Leu Glu His Glu Lys Leu Thr Val Asp		
325	330	335	
Glu Trp Lys Glu His Ile Tyr Lys Glu Ile Val Asn Phe	Ser Pro Ile		
340	345	350	
Ala Arg Lys Asp Ser Arg Arg Arg Ser	Gly Met Lys Leu		
355	360	365	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 76 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

整理番号 159287

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(x) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

GAACCGTTCAC CTTGGATTAT AAGGATGATG ATTTATAAAGC CCTCTATGCC AGAAAGCCCT	60
TCTTGAAAGA GCGCT	76

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(a) LENGTH: 68 base pairs

(b) TYPE: nucleic acid

(c) STRANDEDNESS: single

(d) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(x) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

CCCTGCTGTA GAAACGTTT TTCCGGATCA GGCTTTTATC ATCATCATCT TGTATATCCG	60
TGGTACCG	68

整理番号 159287

WHAT IS CLAIMED IS

1. An isolated polynucleotide comprising a member selected from the group consisting of:
 - (a) a polynucleotide having at least a least 75% identity to a polynucleotide encoding a polypeptide comprising amino acids of SEQ ID NO: 2;
 - (b) a polynucleotide which by virtue of the redundancy of the genetic code, encodes the same amino acids of SEQ ID NO: 2;
 - (c) a polynucleotide which is complementary to the polynucleotide of (a) or (b); and
 - (d) a polynucleotide comprising at least 15 contiguous bases of the polynucleotide of (a), (b) or (c).
2. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is DNA.
3. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is RNA.
4. The polynucleotide of Claim 2 comprising nucleotides set forth in SEQ ID NO: 1.
5. The polynucleotide of Claim 2 comprising nucleotides 1-1838 set forth in SEQ ID NO: 1.
6. The polynucleotide of Claim 2 which encodes a polypeptide comprising amino acids of SEQ ID NO: 2.
7. A vector comprising the DNA of Claim 2.
8. A host cell comprising the vector of Claim 7.
9. A process for producing a polypeptide comprising expressing from the host cell of Claim 8 a polypeptide encoded by said DNA.
10. A process for producing a cell which expresses a polypeptide comprising transforming or transfecting the cell with the vector of Claim 7 such that the cell expresses the polypeptide encoded by the human cDNA contained in the vector.
11. A polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 80% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.
12. A polypeptide comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2.
13. An agonist to the polypeptide of claim 11.
14. An antibody against the polypeptide of claim 11.
15. An antagonist to the polypeptide of claim 11.
16. A method for the treatment of a patient having need of CSBPI comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the polypeptide of claim 11.

整理番号 159287

17. The method of Claim 16 wherein said therapeutically effective amount of the polypeptide is administered by providing to the patient DNA encoding said polypeptide and expressing said polypeptide *in vivo*.
18. A method for the treatment of a patient having need to CSBP β polypeptide comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the antagonist of Claim 13.
19. A process for diagnosing a disease or a susceptibility to a disease related to expression of the polypeptides of claim 11 comprising determining a mutation in the nucleic acid sequence encoding said polypeptide.
20. A diagnostic process comprising analyzing for the presence of the polypeptide of claim 11 in a sample derived from a host.
21. A method for identifying compounds which bind to and activate or inhibit a receptor for the polypeptide of claim 11 comprising:
 - a. contacting a cell expressing on the surface thereof a receptor for the polypeptide, said receptor being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to the binding of a compound to said receptor, with a compound to be screened under conditions to permit binding to the receptor; and
 - b. determining whether the compound binds to and activates or inhibits the receptor by detecting the presence or absence of a signal generated from the interaction of the compound with the receptor.
22. A method for identifying a compound as a CSBP β , comprising:
 - a. contacting a known CSAID labelled with an analytically detectable reagent with a CSBP β under conditions sufficient to form a CSAID/CSBP β complex;
 - b. contacting said complex with a sample comprising a compound to be identified; and
 - c. identifying the compound as a CSAID by detecting the ability of said compound to alter the amount of labelled CSAID in said complex.
23. The method according to Claim 22 wherein the CSBP β is in a form selected from the group consisting of whole cells, cytosolic cell fractions, membrane cell fractions, and purified or partially purified form.

登録番号 159287

24. A method for identifying a compound as a CSAID comprising:
- forming soluble cytosolic fraction from a cell expressing a CSBP β ;
 - contacting said fraction with a CSAID labelled with an analytically detectable reagent under conditions sufficient to form a reagent CSAID/CSBP β complex;
 - contacting said complex with a sample containing a CSAID; and
 - detecting the CSAID by measuring a decrease of the amount of reagent in the labelled CSAID/CSBP β complex.
25. The method according to Claim 24 wherein said cell is a human monocyte.
- 10 26. The method according to Claim 24 wherein said cell is a recombinant host cell.
27. The method according to Claim 24 wherein said reagent is a radioactive label.
- 15 28. A method for identifying ligands capable of binding to a CSBP β , comprising:
 - contacting a recombinant host cell expressing a CSBP β with a ligand to be identified under conditions to permit binding; and
 - detecting the presence of any ligand-bound protein.
29. The method according to Claim 28 wherein the recombinant host cell expresses said CSBP β at its cell surface.
- 20 30. The method according to Claim 28 wherein the protein or a membrane fraction containing the protein is isolated from said cell prior to contacting with the ligand to be identified.
31. An antagonist or agonist compound identified by the method of Claim 22.
32. A pharmaceutical composition comprising a compound identified by the method of Claim 22 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 25 33. A transgenic non-human mammal capable of expressing in any cell thereof the DNA of Claim 1.
34. A method of screening compounds to identify those compounds which bind to a human CSBP β , comprising:
 - contacting the fusion protein comprising a CSBP β domain and a binding protein/ligand binding indicator domain with a plurality of compounds under conditions to permit binding to the CSBP β domain; and

整理番号 159287

- b. identifying those candidate drugs capable of enhancing or inhibiting the activity of the protein/ligand binding indicate domain.

35. A method of screening compounds to identify those compounds which bind and inhibit the kinase activity of human CSBP β , comprising:

- a. contacting CSBP β with a plurality of compounds under conditions to permit binding to the CSBP β ; and
b. identifying those candidate drugs capable of enhancing or inhibiting the kinase activity CSBP β .

36. A method of screening compounds to identify those compounds which bind and inhibit the activation of human CSBP β kinase activity comprising:

- a. contacting CSBP β with a plurality of compounds under conditions to permit binding to the CSBP β ; and
b. identifying those candidate drugs capable of enhancing or inhibiting the activation of the kinase activity of CSBP β .

37. A method of treating a cytokine-mediated inflammatory disease by administering to a patient in need thereof an CSBP β -inhibiting amount of a CSAID.

38. The method according to Claim 36 wherein said disease is selected from the group consisting of SDAT, MS, cerebral malaria, stroke, head trauma, spinal cord injury, atherosclerosis, restenosis, ARDS, RA, OA, IBD, psoriasis, dermatitis, asthma, osteoporosis, sepsis, chronic renal failure, transplant rejection, lupus, graft versus host disease, AIDS and cachexia.

39. The method according to Claim 36 wherein said CSAID inhibits the kinase activity of said CSBP β .

40. The method according to Claim 36 wherein said CSAID inhibits the association of the CSBP β with its substrate.

41. A CSAID which functions by inhibiting the kinase activity of CSBP β and/or the association of a CSBP β with its substrate.

FIGURE I

卷之三

8-3(2)

整理番号 159287

ペ~9(3)

GGATTCAGCTTCACTTGATTCGCTTCAGTTCTCGGGCTCGAAATTTCGATGAA 1560
GCTTTTGACGGCTTGTCTTGTCTTGAAGCTTTCGGAAAGAAATCTTCCCTGGCTT 1620
TTTACCTTGGCGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCT 1680
CCTTCCT 1740
GCTTAATGCTGTTGATCTTGTGATCTTATTAATTAACTTCAAAATCTCTCTCTCT 1800
CAAACTAAGCTGCAATTCTCAGTTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCT 1860

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

This invention relates to drug binding proteins, to genes encoding same and to assays and methods for screening pharmaceuticals. More specifically, this invention relates to a Cytokine Suppressive Anti-Inflammatory Drug (CSAID) binding protein CSBPs, to a gene encoding same and to assays and screens useful in the evaluation and characterization of drugs of this pharmacologic class.